

## Research Paper

# The Effect of Chitosan Priming on Germination and Biochemical Characteristics of Black Seed (*Nigella sativa* L.) under Cadmium Stress

Ellahé Arab<sup>1</sup>, Leila Ahangar<sup>2</sup> and Abbas Biabani<sup>3</sup>

1- Master's student, Gonbad Faculty of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gonbad Kavos University, Gorgan, Iran

2- Assistant Professor, Department of Plant Production, Gonbad Faculty of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gonbad Kavos University, Gorgan, Iran, (Corresponding author: L.ahangar63@gmail.com)

3- Professor, Department of Plant Production, Gonbad Faculty of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gonbad Kavos University, Gorgan, Iran

Received: 18 June, 2024

Revised: 9 September, 2024:

Accepted: 29 October, 2024

### Extended Abstract

**Background:** Black seed (*Nigella sativa* L.) from the Ranunculaceae family is one of the natural useful antioxidants, and the oil prepared from its seeds has various medicinal properties, including anti-cancer, anti-microbial, anti-hypertensive, anti-diabetic and increased immunity has been reported. *Nigella sativa*, like other plants, is constantly exposed to abiotic or biotic stresses. The main abiotic stresses that plants are exposed to include extreme temperature, drought, high salinity and heavy metals. Environmental pollution caused by heavy metals is increasing. Among heavy metals, cadmium is one of the most toxic elements for living organisms, which has received much attention due to its increase in the environment in recent decades. This element is toxic to most plants even in very low concentrations, while in concentrations higher than five to ten micrograms per gram of dry leaf weight, it can lead to the death of the plant. The presence of this element in the growth environment of plants causes a lot of poisoning, including disruption of water-plant relations, disruption of chlorophyll biosynthesis and formation of free ions. Therefore, it is necessary to adopt appropriate environmental methods to reduce or eliminate the negative and irreparable effects of this metal in agriculture. Seed priming is known to be an effective method to improve plant performance by increasing plant tolerance to stress. One of the types of priming methods is the use of chemicals such as chitosan. Chitosan is a non-toxic and environmentally adaptive substance that is very important due to its antioxidant activity in dealing with oxidative damage resulting from environmental stress. Therefore, in this study, the effect of chitosan priming on reducing the harmful effects of cadmium on germination and biochemical characteristics of black seed was investigated.

**Methods:** In this study, in order to investigate the effect of chitosan priming on cadmium chloride stress on the germination and biochemical characteristics of *Nigella sativa*, the experiment was carried out as a factorial design based on completely randomized design with 4 replications in sterile petri dishes in the laboratories of Gonbadkavos Agricultural University in 2023. For seed priming with different concentrations of chitosan (0.2, 0.4, 0.6, 1.0%), the seeds were immersed in the desired solutions for 3 hours under dark conditions and after drying, they were placed in Petri dishes on Whatman paper bed. Then 5 ml of solutions prepared with different concentrations of cadmium chloride (control, 1000, 750, 500, 250  $\mu\text{mol}$ ) were added to them. Distilled water was used for control treatment. Finally, the samples were placed for 10 days in the germinator in dark conditions with a temperature of  $25 \pm 1$  °C. At the end of the experiment, the characteristics of germination percentage, germination rate, seedling vigor index, root and shoot length were measured. Then the biochemical traits of seedlings such as catalase, peroxidase, phenol, soluble sugar and proline were measured after 14 days. Statistical analysis of data was done using SAS 9.1 and MSTAT-C software.

**Results:** The results of analysis of variance indicated the significant simple effects of priming with chitosan and cadmium stress on all investigated traits. Also, the interaction effects of priming  $\times$  cadmium stress were also significant for all traits at the 1% level. The comparison of average data showed that with the increase of cadmium concentration, germination rate and percentage, radicle length and seedling vigor index decreased significantly, so that the highest amount of these traits was in the control and 250  $\mu\text{mol}$  cadmium and the lowest amount of these traits was observed at a concentration of 1000  $\mu\text{mol}$  cadmium. The external application of chitosan in the form of priming improved germination traits, root and shoot length and seedling vigor index in 0.2 and 0.4% chitosan treatments compared to the control, while with the increase in the



percentage of chitosan (0.8 and 1 percent) the amount of these traits decreased significantly. The results of the comparison of average traits under the interaction of chitosan  $\times$  cadmium showed that seed priming with chitosan was able to reduce the negative effects of cadmium chloride stress on the traits of percentage germination, root and shoot length and seedling vigor index. Thus, the highest amount of these traits was observed in the treatment of 0.2 and 0.4% chitosan and 250 and 500  $\mu\text{mol}$  cadmium stress. Also, the results of the present study showed that increasing the concentration of cadmium chloride causes an increase in the activity of antioxidant enzymes such as catalase and peroxidase and non-enzymatic antioxidants such as proline and phenol. So that peroxidase enzyme at the treatment of 750  $\mu\text{M}$  of cadmium (0.0053  $\mu\text{mol}$  per gram of fresh tissue) with an increase of 178.2% compared to the control and phenol in the treatment of 1000  $\mu\text{M}$  of cadmium (3.2 mg/g of extract) with an increase of 211.7 % compared to the control showed the highest level of activity. Also, the use of seed priming technique with chitosan could significantly increase the content of these proteins in plants under cadmium stress. So that, the highest amount of peroxidase enzyme is observed in the treatment of 500  $\mu\text{M}$  cadmium in the priming treatment with 0.4% chitosan (0.0083  $\mu\text{mol}$  Bergam of fresh tissue) and in the treatment of 750  $\mu\text{M}$  cadmium chloride in the priming treatment 0.2% chitosan (0.0082  $\mu\text{mol}$  Bergam) fresh tissue). That this amount was about 64 and 57.6% more than their controls, respectively.

**Conclusion:** The results of this research showed that cadmium stress leads to a decrease in germination characteristics and weakens the plant's defense system. To deal with these changes and reduce the adverse effects of the produced ROS, the plant increased the activity of antioxidant enzymes, but the adverse effects of cadmium had an inhibitory effect on these changes. Conversely, the use of chitosan in the form of priming prevented the harmful effects of cadmium and increased the activity of antioxidant enzymes and protected the germination process against the toxicity of this heavy metal. Although the application of chitosan up to 0.6% improved these mechanisms, its beneficial effects decreased with the increase in the concentration of this substance. Based on the results of the present study, it can be stated that the application of chitosan caused the activation of some biochemical and physiological mechanisms in the black seed plant under cadmium stress. Therefore, seed priming with chitosan can be suggested as an effective strategy to increase *Nigella sativa* tolerance to cadmium stress.

**Keywords:** Antioxidant enzymes, Catalase, Heavy metal stress, Pretreatment, Proline

**How to Cite This Article:** Arab, E., Ahangar, L., & Biabani, A. (2025). The effect of chitosan priming on germination and biochemical characteristics of black seed (*Nigella sativa* L.) under cadmium stress. *J Crop Breed*, 17(1), 142-158. DOI: 10.61186/jcb.17.1.142



سمیت میل ترکیبی شدید آن با گروه‌های تیول در آنزیم‌های پروتئین‌ساز است که به‌صورت طبیعی همراه با عنصر روی یافت می‌شود (Rodriguez et al., 2008).

پرایمینگ بذر یکی از روش‌های برجسته‌ای است که منجر به جوانه‌زنی سریع و یکنواخت، کیفیت بذر و استقرار گیاهچه شده و منجر به افزایش رشد گیاه می‌شود (Abid et al., 2016). پرایمینگ بذر همچنین به‌عنوان یک روش بالقوه برای بهبود عملکرد گیاه با افزایش تحمل گیاه به تنش‌های غیرزیستی و زیستی شناخته شده‌است (Khalaki et al., 2020). حتی پرایمینگ بذر می‌تواند جوانه‌زنی بذرهای ضعیف و آسیب‌دیده در شرایط نامساعد محیطی را بهبود بخشد (Dragicevic et al., 2013). در مطالعات مختلف اثر مثبت پرایمینگ با کیتوزان بر جوانه‌زنی و پارامترهای رشدی گیاهان مختلف گزارش شده است (Spanany & Fallah, 2016). کیتوزان یک ماده غیرسمی، قابل تجزیه و سازگار با محیط‌زیست و همچنین یک پلی‌ساکارید گلوکوزامین ساخته شده از کیتین است. کیتوزان به‌دلیل فعالیت آنتی‌اکسیدانی در برخورد با آسیب‌های اکسیداتیو حاصل از تنش محیطی بسیار حائز اهمیت است و جهت مقابله گیاه با تنش‌های محیطی، موجب فعال شدن آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت مانند کاتالاز در شرایط تنش می‌شود (Rahneshan et al., 2019; Xiaochen et al., 2020). پرایمینگ با کیتوزان، مقاومت گیاهان به برخی از بیماری‌های گیاهی را افزایش می‌دهد. همچنین سرعت و درصد جوانه‌زنی، میزان فعالیت لیپاز، سطوح اسیدجیرلیک و ایندول‌استیک‌اسید دانه و کیفیت محصول را بهبود می‌بخشد. همچنین باعث افزایش آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت در بذر می‌گردد (Zhou et al. 2002; Shao et al. 2005). پژوهش‌های انجام‌شده نشان دادند که پرایمینگ کیتوزان اثر تقویتی مطلوبی بر جوانه‌زنی بذر *Platycodon grandiflorus* داشت و سرعت جوانه‌زنی، شاخص بنیه و همچنین طول لپه و ریشه‌چه را افزایش داد. علاوه بر این، پرایمینگ کیتوزان به‌طور موثری رشد برگ، ارتفاع، قطر ساقه و وزن خشک را افزایش داد و به‌طور قابل توجهی کلروفیل، سرعت فتوسنتز، سرعت تعرق و راندمان مصرف آب را بهبود بخشید (Liu et al., 2022). همچنین پرایمینگ با کیتوزان با افزایش فعالیت کاتالاز و پراکسیداز سبب مقاومت ذرت به تنش خشکی گردید (Behboudi et al., 2018).

با توجه به افزایش آلودگی خاک‌های زراعی به عناصر سنگین از جمله کادمیوم، هدف از این تحقیق بررسی تأثیر پیش‌تیمار بذر گیاه سیاهدانه با کیتوزان به‌منظور کاهش اثرات نامطلوب آلودگی به کادمیوم، به‌ویژه در مرحله جوانه‌زنی و بررسی تغییرات بیوشیمیایی آن بود.

## مواد و روش‌ها

برای بررسی تأثیر پرایمینگ بذر با کیتوزان بر ویژگی‌های جوانه‌زنی گیاه دارویی سیاهدانه، تحقیقی در محیط آزمایشگاه و شرایط درون شیشه‌ای، در دانشکده کشاورزی دانشگاه گنبد کاووس در سال ۱۴۰۲ اجرا شد. بذر گیاه سیاهدانه (*Nigella sativa*) از شرکت پاکان بذر اصفهان تهیه گردید. آزمایش به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۴ تکرار در پتری‌های استریل اجرا شد. عوامل آزمایش شامل ۶ سطح کیتوزان (صفر، ۰/۲، ۰/۴، ۰/۶، ۰/۸، ۱ درصد) و ۵ سطح کادمیوم (صفر، ۵۰، ۲۵۰، ۷۵۰، ۱۰۰۰ میلی‌مولار) بودند. مقدار پودر مورد نیاز از کلرید کادمیوم (Tetrachem, cas No, 35658-65-2) و کیتوزان (Sigma Alderich/ MMW) شرکت (Steinheim, Germany) را

(RNS) باعث ایجاد استرس اکسیداتیو و کاهش کیفیت در گیاه دارویی می‌شوند (Huang et al., 2012, Schieber & Chandel 2014). عمده‌ترین تنش‌های غیرزیستی که گیاهان در معرض آن قرار دارند شامل دمای شدید، خشک‌سالی، شوری زیاد و فلزات سنگین می‌باشند (Gornik et al., 2008). در بین فلزات سنگین، فلز کادمیوم به‌دلیل تحرک و پویایی زیاد در خاک و جذب توسط گیاه، دارای اهمیت خاصی می‌باشد (Khatamipour et al., 2011; John et al., 2009). این فلز در محیط در دسترس است اما برای رشد گیاه ضروری نیست. حد مجاز کادمیوم در خاک کشاورزی ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم است (Balestrasse et al., 2004). مقادیر بالای کادمیوم مشاهده شده در بسیاری از مزارع کشاورزی ناشی از استفاده طولانی مدت از کودهای فسفاته و آبیاری از طریق فاضلاب است. لذا به‌دلیل افزایش مقدار کادمیوم در محیط طی دهه‌های اخیر بسیار مورد توجه قرار گرفته‌است. کادمیوم از خطرناک‌ترین فلزات سنگین برای گیاهان محسوب می‌شود (Kanafi et al., 2004; Lesko Kelayeh et al., 2021; Choudhury & Panda, 2004). که در غلظت‌های بسیار کم نیز برای گیاهان سمی است، در حالی که در غلظت‌های بالاتر از پنج تا ده میلی‌گرم بر گرم وزن خشک برگ، می‌تواند منجر به مرگ گیاه شود (White & Brown., 2010). سمیت کادمیوم فرآیندهای مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی گیاه را تغییر می‌دهد که شامل مهار و ناهنجاری در بسیاری از گونه‌های گیاهی است. پس از مواجهه طولانی مدت گیاه با کادمیوم، ریشه‌ها موسیلاژین، قهوه‌ای تجزیه می‌شوند و تعداد ساقه‌ها و افزایش طول ریشه کاهش می‌یابد. کادمیوم از تشکیل ریشه جانبی جلوگیری می‌کند و باعث می‌شود که ریشه اصلی قهوه‌ای، سفت و پیچ‌خورده شود (Spanany et al., 2016). این فلز همچنین می‌تواند ظرفیت فتوسنتزی را کاهش دهد که منجر به کندی رشد گیاه و استرس اکسیداتیو شود و بر متابولیسم ثانویه تأثیر بگذارد. از سوی کادمیوم با مهار فعالیت نیترات ردوکتاز در اندام هوایی، جذب نیترات و انتقال آن از ریشه به اندام هوایی را کاهش می‌دهد (Basra et al., 2006). سمیت کادمیوم می‌تواند بر نفوذپذیری غشای پلاسما تأثیر بگذارد و باعث کاهش محتوای آب شود. مطالعات نشان داده شده‌است که تیمارهای کادمیوم فعالیت ATPase بخش غشای پلاسمایی ریشه گندم و آفتابگردان را کاهش می‌دهد (Bermudes et al., 2010). در حالی که در سیر (*Allium sativum*) تجمع کادمیوم رشد شاخساره را کاهش داده و در نهایت در ذرت (*Zea mays*) باعث کاهش رشد ساقه و مهار رشد ریشه شد (Aghighi Shahverdi et al., 2017). جوانه‌زنی بذر و رشد ریشه گیاهچه از مراحل مهم رشد گیاه و حساس‌ترین مرحله گیاهان به تغییرات محیط اطراف آن‌هاست (Liu et al., 2011). تجمع کادمیوم در بافت‌های گیاهی باعث ایجاد چندین علامت سمیت می‌شود، اولین علامت تجمع کادمیوم کاهش رشد و نمو در جوانه‌زنی گیاهچه می‌باشد (Perveen et al., 2016). کادمیوم با توجه به میزان غلظت می‌تواند سبب ممانعت از جذب آب در محور جنبینی و در نتیجه کاهش جوانه‌زنی شود (Vijayaragavan et al., 2011). اثر کادمیوم بر جوانه‌زنی گیاهان به عوامل مختلفی از جمله نوع گیاه، غلظت کادمیوم، مدت زمان تعرض و شرایط زیستی بستگی دارد (Rahoui et al., 2010). کالای و همکاران (Kalai et al., 2014) بیان کردند که کاهش جوانه‌زنی به‌دلیل کاهش جذب آب نیست، بلکه به‌دلیل کاهش انتقال مواد اندوخته‌ای از اندوسپرم به جنین است. مطالعات نشان داده کادمیوم و روی از نظر بیوشیمیایی بسیار مشابه هستند، بنابراین کادمیوم می‌تواند جایگزین روی در انجام وظایف متابولیسمی شود. علت اصلی

سنجش میزان فعالیت آنزیمی بر اساس میزان تغییرات جذب و ضریب خاموشی آنزیم پراکسیداز (۲۶/۶) بر حسب میکرومول بر گرم بافت تازه محاسبه گردید (رابطه ۴).

$$POD = \frac{\Delta A_{240} \times 1 \times V_t \times df}{\varepsilon \times l \times t \times V_s}$$

$\Delta A_{470}$  تفاوت میزان جذب مخلوط واکنش در زمان شروع و پایان واکنش  
1 ضریب پراکسیدهیروژن در معادله که معادل ۴ می باشد

$V_t$  حجم مخلوط واکنش

$df$  فاکتور رقیق کننده

$T$  مدت زمان واکنش

$V_s$  حجم نمونه

$\varepsilon$  ضریب خاموشی

$l$  طول مسیر عبور نور از مخلوط واکنش

#### سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT)

برای اندازه گیری فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT) 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 با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر اندازه گیری شد (Chance & maehly, 1955). میزان فعالیت آنزیم با استفاده از ضریب خاموشی کاتالاز (۳۹/۴) بر اساس سرعت مصرف هیدروژن پراکسید در دقیقه بر حسب میکرومول بر گرم بافت تازه محاسبه گردید.

#### اندازه گیری میزان قند محلول

اندازه گیری میزان قند محلول با استفاده از روش (Gengmao *et al.*, 2014) انجام گرفت. بدین منظور ۰/۵ گرم بافت سبز گیاه به همراه ۱۰ سی سی الکل اتانول ۹۵٪ در لوله های آزمایش در بسته قرار داده و به مدت ۱ ساعت در حمام بن ماری در دمای ۸۰ درجه سانتی گراد حرارت داده شد. سپس به ۱ سی سی از نمونه حاصل، ۱ سی سی فنول ۵/۵ درصد و ۵ سی سی اسیدسولفوریک ۹۸٪ اضافه شد. منحنی جذب تغییرات با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر در طول موج ۴۸۳ نانومتر قرائت شد. در نهایت میزان قند محلول استخراجی بر اساس میزان تغییرات جذب در میکروگرم گلوکز در گرم وزن تر محاسبه شد.

#### اندازه گیری فنول کل

برای اندازه گیری فنول کل میزان ۱۰۰ میلی لیتر از حلال های اتانول و متانول ۸۰ درصد (حجمی حجمی) با ۱۰ گرم از پودر خشک گیاه مخلوط و در انکوباتور شیکردار با دمای ۲۵ درجه سانتی گراد قرار گرفت. بعد از طی ۲۴ ساعت عصاره ها با کاغذ صافی واتمن شماره یک صاف شدند. سپس مقدار ترکیبات فنلی کل با روش فولین سیوکالتو اندازه گیری شد. در این روش میزان ۲۰ میکرولیتر از محلول عصاره (قبل از مرحله تغلیظ و خشک نمودن با فریز درایر) با ۱/۱۶۰ میلی لیتر آب مقطر و ۱۰۰ میکرولیتر معرف فولین سیوکالتو مخلوط شد و بعد از گذشت ۱ تا ۸ دقیقه، ۳۰۰ میکرولیتر محلول کربنات سدیم (۲۰ درصد) به آن ها افزوده شد. لوله های آزمایش بعد از تکان دادن در حمام آب گرم با دمای ۴۰ درجه سانتی گراد قرار گرفته و پس از گذشت ۳۰ دقیقه جذب آن ها با دستگاه اسپکتروفوتومتر با طول موج ۷۶۰ نانومتر خوانده شد. جهت رسم منحنی استاندارد از اسیدگالیک استفاده شد. میزان کل ترکیبات فنلی موجود در عصاره با استفاده از معادله به دست آمده از منحنی استاندارد محاسبه و نتایج بر حسب میلی گرم اسیدگالیک در گرم عصاره محاسبه شد (Arabshahi-Delouee & Urooj, 2007).

۹۷۰-۷۳۲۹-۴۹) با ترازی ۰/۰۱ گرم اندازه گیری و سپس با آب مقطر به حجم مورد نیاز تحقیق رسانیده شد. در این پژوهش قبل از اعمال پرایمینگ ابتدا بذور با آب معمولی شست شوی سطحی شده، سپس به مدت ۱۰ ثانیه در اتانول ۷۰ درصد قرار داده شدند. پس از سه مرتبه شست و شو با آب مقطر به مدت ۳ دقیقه در محلول هیپوکلریت سدیم ۵ درصد قرار گرفتند و در نهایت چندین مرتبه با آب مقطر شست و شو داده شدند (Madadi *et al.*, 2016). برای پرایمینگ بذور با غلظت های مختلف کیتوزان (حل شده در اسیداستیک ۰/۱ درصد و آب مقطر)، بذرها به مدت ۳ ساعت در دمای ۲۵ درجه سلسیوس و تحت شرایط تاریکی درون محلول های مورد نظر غوطه ور شدند (Naderi *et al.*, 2014). سپس بذور در زیر هود خشک شده و بر روی بستر کاغذ واتمن شماره یک با قطر ۹ سانتی متر در پتری های استریل ۵۰ عدد بذر پرایم شده برای هر تیمار قرار داده شدند و مقدار ۵ میلی لیتر از محلول های آماده شده با غلظت های مختلف کلرید کادمیوم به آن ها اضافه گردید. برای تیمار شاهد از آب مقطر استفاده شد. در نهایت نمونه ها به مدت ۱۰ روز در شرایط تاریکی و در دمای متناوب ۲۵-۲۰ درجه سانتی گراد و رطوبت نسبی ۵۰ درصد در دستگاه ژرمیناتور قرار داده شدند. ملاک جوانه زنی بر اساس خروج ریشه چه و ساقچه های سالم به اندازه ۲ میلی متر می باشد (Miller & Chapman, 1987). در انتهای آزمایش صفات درصد جوانه زنی از رابطه ۱، سرعت جوانه زنی از رابطه ۲، شاخص بنیه گیاهچه از رابطه ۳، محاسبه شدند (Pagter *et al.*, 2009). همچنین ۵ عدد از گیاهچه ها از هر تیمار به صورت تصادفی انتخاب و طول ریشه چه، ساقچه چه و گیاهچه بر حسب میلی متر و وزن تر گیاهچه بر حسب گرم اندازه گیری شد (Akramian *et al.*, 2007).

رابطه ۱: درصد جوانه زنی (GP)  $GP = (n/N) \times 100$

$n$ : مجموع کل بذرها جوانه زده در پایان آزمایش  
 $N$ : کل بذرها کاشته شده

رابطه ۲: سرعت جوانه زنی (GR)  $GR = \sum Ni / Ti$  (بذر در روز)  
 $Ni$ : تعداد بذرها جوانه زده در روز  $i$ ،  $Ti$ : تعداد روزهای پس از جوانه زنی

رابطه ۳: شاخص بنیه بذر  $100 / (GP \times \text{طول گیاهچه}) =$  شاخص بنیه گیاهچه

$Gp$ : درصد جوانه زنی

تغییرات بیوشیمیایی گیاهچه ها بعد از ۱۴ روز اندازه گیری شد. برای اندازه گیری فعالیت آنی اکسیدانسی حدود ۰/۵ گرم بافت اندام هوایی گیاهی در هاون چینی در مجاورت نیتروژن مایع پودر شد سپس با ۵۰۰ میکرولیتر بافر فسفات پتاسیم ۱۰۰ میلی مولار (pH=7) همگن گردید. مخلوط حاصل به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۱۲۰۰۰ rpm در دمای ۴ درجه سانتی گراد سانتریفیوژ شد. از محلول شفاف رویی برای انجام آزمایش های بیوشیمیایی استفاده گردید.

#### سنجش فعالیت آنزیم (POX)

فعالیت آنزیم پراکسیداز (POD) بر اساس اکسیداسیون گایاکول با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر مدل Shimadzu UV-120-02 به مدت ۲ دقیقه در طول موج ۴۳۶ نانومتر خوانده شد. مخلوط واکنش شامل 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 می باشد. از محلول واکنش بدون عصاره جهت صفر کردن دستگاه استفاده شد (Chance & maehly, 1955).

### اندازه‌گیری پرولین

اندازه‌گیری پرولین بر اساس روش (Bates et al., 1973) انجام گرفت. بدین منظور مقدار ۰/۰۵ گرم برگ تازه همراه با ۱۰ میلی‌لیتر سولفوسالیسیلیک ۳ درصد در یک هاون چینی به مدت ۳ دقیقه سائیده شد. محلول هموزنیزه شده توسط کاغذ صافی واتمن شماره ۲ صاف شد. سپس ۲ میلی‌لیتر از محلول صاف شده با ۲ میلی‌لیتر از معرف نین‌هیدرین و ۲ میلی‌لیتر اسیداستیک در یک لوله‌ی آزمایش ریخته شد و برای مدت یک ساعت در دمای ۹۰ درجه سانتی‌گراد در حمام آب گرم قرار داده شد. سپس به محلول واکنش سرد شده در لوله آزمایش ۴ میلی‌لیتر تولوئن اضافه گردید و به مدت ۱۵ تا ۲۰ ثانیه به شدت تکان داده شد. در نهایت جذب نوری محلول رویی واکنش از طریق دستگاه اسپکتروفوتومتر در طول موج ۵۲۰ نانومتر خوانده شد و غلظت اسیدآمینه پرولین نمونه با استفاده از یک منحنی استاندارد پرولین خالص بر حسب میکرومول بر گرم بافت تازه تعیین گردید.

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS و MSTAT-C انجام شد و مقایسه میانگین‌ها به وسیله آزمون LSD در سطح ۵٪ محاسبه شد. همچنین برای رسم نمودارهای مورد نیاز از نرم‌افزار Excell استفاده شد.

### نتایج و بحث

نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اثر تنش کادمیوم، پرایمینگ با کیتوزان و اثر متقابل پرایمینگ × تنش کادمیوم برای صفات درصد و سرعت جوانه‌زنی، شاخص بنیه، طول ریشه‌چه و ساقچه، وزن تر گیاهچه، محتوی آنزیم کاتالاز، پراکسیداز، محتوی پرولین، قند محلول و فول در سطح آماری یک درصد معنی‌دار بود (جدول ۱).

#### درصد جوانه‌زنی

نتایج مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که با افزایش غلظت کادمیوم درصد جوانه‌زنی به طور معنی‌داری کاهش یافت به طوری که بیشترین درصد جوانه‌زنی در سطح شاهد (۴۱/۸ درصد) و ۲۵۰ میکرومولار کلرید کادمیوم (۴۱/۸ درصد) و کمترین میزان این صفت در غلظت ۱۰۰۰ میکرومولار کلرید کادمیوم (۲/۴ درصد) مشاهده شد. این میزان کاهش حدود ۹۶/۸ درصد کمتر از شاهد بود (شکل ۱). پرایمینگ سبب بهبود ۱۰/۵، ۱۴/۵ و ۴/۵ درصدی این صفت به ترتیب در تیمارهای ۰/۲، ۰/۴، ۰/۶ و ۰/۸ درصدی کیتوزان نسبت به شاهد شد ولی این افزایش تفاوت معنی‌داری با شاهد نداشت. از سویی با افزایش غلظت کیتوزان میزان جوانه‌زنی کاهش یافت به طوری که در غلظت یک درصد کیتوزان، میزان درصد جوانه‌زنی حدود ۷۶ درصد نسبت به شاهد کاهش یافت. نتایج مقایسه میانگین درصد جوانه‌زنی تحت برهم‌کنش پرایمینگ کیتوزان و کادمیوم نشان داد که بیشترین میزان این صفت در شرایط ۲۵۰ میکرومولار کلرید کادمیوم مربوط به پرایمینگ ۰/۴ درصد کیتوزان (۴۵/۷ درصد) و در شرایط ۲۵۰ میکرومولار کلرید کادمیوم مربوط به پرایمینگ ۰/۲ درصد کیتوزان (۴۴/۳ درصد) و در شرایط ۵۰۰ میکرومولار کلرید کادمیوم مربوط به پرایمینگ ۰/۴ درصد کیتوزان (۳۳/۲ درصد) بود.

#### سرعت جوانه‌زنی

بر اساس نتایج مقایسه میانگین داده‌ها، افزایش غلظت کادمیوم سرعت جوانه‌زنی را به طور معنی‌داری کاهش داد. تیمار شاهد با ۵۷/۸ درصد بیشترین و تیمار ۱۰۰۰ میکرومولار کلرید کادمیم با ۱۹/۵ درصد، کمترین سرعت جوانه‌زنی را داشتند (شکل ۲). پرایمینگ کیتوزان در سطح ۰/۲ درصد با میزان ۶۳ درصد سبب بهبود ۹ درصدی صفت سرعت جوانه‌زنی گردید ولی با افزایش غلظت کیتوزان سرعت جوانه‌زنی

کاهش یافت به طوری که در غلظت یک درصد کیتوزان میزان این صفت حدود ۴۶/۸ درصد کاهش یافت. نتایج اثر متقابل نشان داد که پرایمینگ با کیتوزان سبب بهبود سرعت جوانه‌زنی گردید به طوری که غلظت ۰/۲ درصد کیتوزان سبب بهبود سرعت جوانه‌زنی در تمام غلظت‌های آلودگی با کلرید کادمیوم شد. همچنین در پرایمینگ ۰/۸ درصد کیتوزان و آلودگی ۲۵۰ میکرومولار کلرید کادمیوم بیشترین سرعت جوانه‌زنی (۴۴/۴ درصد) مشاهده شد که این میزان ۴۵/۶ درصد بیشتر از شاهد (بدون پرایمینگ) بود. بعد از آن بیشترین سرعت جوانه‌زنی در پرایمینگ ۰/۴ درصد کیتوزان و آلودگی ۵۰۰ میکرومولار کلرید کادمیوم و در پرایمینگ ۰/۴ درصد کیتوزان و آلودگی ۲۵۰ میکرومولار کلرید کادمیوم دیده شد. از سویی افزایش سطح کیتوزان و کادمیوم سبب روند کاهشی سرعت جوانه‌زنی شد. به طوری که کمترین سرعت جوانه‌زنی در پرایمینگ یک درصد کیتوزان و آلودگی ۱۰۰۰ میکرومولار کلرید کادمیوم دیده شد.

جوانه‌زنی بذر از مراحل پیچیده و اولیه رشد گیاه می‌باشد که از طریق اثراتی که روی استقرار گیاهچه دارد، عملکرد را بهبود می‌بخشد. بر اساس نتایج به دست آمده از این مطالعه تنش کادمیوم سبب کاهش معنی‌دار سرعت و درصد جوانه‌زنی در سیاهدانه شد. تجمع کادمیوم در بافت‌های گیاهی رشد را به تعویق می‌اندازد و باعث ایجاد چندین علامت سمیت می‌شود. اولین علامت تجمع کادمیوم کاهش رشد و نمو است (Menon et al., 2016). این اثر در سطوح مختلف مانند جوانه‌زنی و رشد ریشه و اندام‌هوایی مشاهده می‌شود. بررسی‌ها نشان داد که کادمیوم جوانه‌زنی در گندم را ۳۱ درصد در غلظت‌های ۰/۰۳ تا ۴/۸ میلی‌مولار (Guilherme et al., 2015) و در جو حدود ۲۳ درصد در غلظت ۱۰۰ میلی‌مولار کادمیوم (Kalai et al., 2014) کاهش داد. مطالعات نشان داد که اثر بازدارندگی کادمیوم بر جوانه‌زنی و رشد بذر عمدتاً به دلیل کاهش جذب آب است که مانع رشد جنین بذر می‌شود (Haider et al., 2021). علاوه بر این، غیرفعال شدن تجزیه نشاسته در آندوسپرم، منجر به اختلال در انتقال قندهای محلول به محور جنینی بذر می‌شود و در نهایت کمبود مواد مغذی را در جنین تشدید می‌کند (Rahoui et al., 2015). همچنین گزارش‌هایی مبنی بر کاهش فعالیت آلفا‌امیلاز در نتیجه کاهش انتشار نشاسته از لپها تحت تأثیر تنش کادمیوم وجود دارد (Kalai et al., 2016).

مطالعات نشان داد که با استفاده از تیمارهای افزایش‌دهنده قدرت بذر به صورت پرایمینگ می‌توان به جوانه‌زنی سریع و یکنواخت و استقرار قوی گیاه دست پیدا کرد (Saadat et al., 2022). نتایج مطالعه حاضر نیز حاکی از بهبود سرعت و درصد جوانه‌زنی سیاهدانه تحت پرایمینگ کیتوزان بود. همچنین پرایمینگ ممکن است در شرایط تنش مانند فلزات سنگین منجر به افزایش عملکرد جوانه‌زنی و سبز شدن بذر شود (Sedghi et al., 2010). علت افزایش سرعت و درصد جوانه‌زنی طی پرایمینگ تحت شرایط تنش، افزایش در فعالیت‌های تنفسی، افزایش سنتز پروتئین در جنین، تولید ATP، تحریک فعالیت RNA و پروتئین‌سازی و افزایش فعالیت آنزیم‌های هیدرولیتیک در بذرهای پیش‌تیمار شده، بیان شده است (Saadat et al., 2022). مطالعات اسپندی و فلاح (Spanany & Fallah, 2016) در گیاه سوید و نوری و همکاران (Noori et al., 2022) در گیاه زیره نشان داد که پرایمینگ بذر با کیتوزان تحت شرایط تنش کادمیوم، تأثیر مثبت و بهبود دهنده‌ای بر سرعت و درصد جوانه‌زنی، داشته است. این محققان گزارش کردند پرایمینگ کیتوزان می‌تواند سبب افزایش آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت در بذر گردد که این آنزیم‌ها، فعالیت پراکسیداسیون لیپید را در طی جوانه‌زنی

### طول ساقه‌چه

با افزایش غلظت کادمیوم، طول ساقه‌چه به‌طور معنی‌داری کاهش یافت به‌طوری‌که بیشترین میزان این صفت در شاهد (۴۰/۲۲ میلی‌متر) و کمترین میزان صفت در غلظت ۱۰۰۰ میکرومولار کلرید کادمیوم (۶/۴ میلی‌متر) مشاهده شد که سبب کاهش ۸۴ درصدی طول ساقه‌چه شد (شکل ۴). افزایش غلظت کیتوزان در پرایمینگ سبب روند کاهشی طول ساقه‌چه شد ولی سطوح ۰/۲ درصد با میزان ۳۹/۶ میلی‌متر و ۰/۴ درصد با میزان ۳۶/۴ میلی‌متر تفاوت معنی‌داری را با شاهد نشان ندادند. در غلظت یک درصد کیتوزان، طول ساقه‌چه با میزان ۱۰/۸ میلی‌متر کاهش ۷۳ درصدی را نسبت به شاهد نشان داد. نتایج بررسی طول ساقه‌چه نشان داد که اثر متقابل کیتوزان و کادمیوم اگرچه معنی‌دار بود ولی کیتوزان نقشی در بهبود طول ساقه‌چه تحت تنش کادمیوم ایفا نکرد به‌طوری‌که طول ساقه‌چه در تمام تیمارهای کلرید کادمیوم کیتوزان کمتر از تیمار شاهدشان بود و کمترین میزان صفت در تیمار پرایمینگ یک درصد و آلودگی ۱۰۰۰ میکرومولار کلرید کادمیوم (۱/۵ میلی‌متر) دیده شد.

### طول ریشه‌چه

نتایج مطالعات بیانگر این بود که طول ریشه‌چه به‌میزان زیادی تحت تاثیر پرایمینگ با کیتوزان قرار گرفته است، به‌طوری‌که پرایمینگ کیتوزان در سطوح ۰/۲، ۰/۴ و ۰/۶ درصد به‌ترتیب سبب افزایش ۱۰/۵، ۱۴/۵ و ۵ درصدی طول ریشه‌چه نسبت به شاهد (عدم پرایمینگ) گردید، ولی با افزایش غلظت کیتوزان طول ریشه‌چه کاهش یافت به‌طوری‌که غلظت یک درصد کیتوزان با میزان ۱۵/۰۲ میلی‌متر سبب کاهش ۷۶ درصدی این صفت شد (شکل ۵). از طرفی حضور کادمیوم در بستر کشت بذور سبب کاهش معنی‌دار طول ریشه‌چه در سیاهدانه شد به‌طوری‌که در غلظت ۱۰۰۰ میلی‌مولار کادمیوم با میزان ۲/۴ میلی‌متر و غلظت ۷۵۰ با میزان ۱۶/۷ میلی‌متر بیشترین کاهش نسبت به شاهد (عدم آلودگی) مشاهده شد. اثرات متقابل بین پرایمینگ و تنش به‌لحاظ این صفت بسیار معنی‌دار بود و تکنیک پیش‌تیمار با کیتوزان نقش مهمی در کاهش اثرات سوء تنش کلرید کادمیوم داشت. در تیمار ۰/۴ درصد کیتوزان و تنش ۲۵۰ میکرومولار کادمیوم بیشترین طول ریشه‌چه (۴۵/۸ میلی‌متر) مشاهده شد که این میزان ۹/۶ درصد بیشتر از شاهد (بدون پرایمینگ) بود. سپس بیشترین طول ریشه‌چه در تیمار ۰/۲ درصد کیتوزان و تنش ۲۵۰ میکرو مولار کادمیوم با میزان ۴۴/۳ میلی‌متر و تیمار ۰/۴ درصد کیتوزان و تنش ۵۰۰ میکرومولار مولار کادمیوم با میزان ۳۳/۴ میلی‌متر مشاهده شد.

کاهش داده در نتیجه باعث افزایش جوانه‌زنی می‌شوند که تایید کننده نتایج این مطالعه می‌باشد.

### شاخص بنیه گیاهچه

نتایج مقایسه میانگین نشان داد که افزایش غلظت آلودگی با کلرید کادمیوم شاخص بنیه گیاهچه را به‌طور معنی‌داری کاهش داد به‌طوری‌که کمترین میزان این صفت در غلظت ۱۰۰۰ میکرومولار کلرید کادمیوم (۵/۳۶ درصد) مشاهده شد که بیانگر کاهش ۹۴/۸ درصدی شاخص بنیه گیاهچه نسبت به شاهد بود (شکل ۳). تیمار پرایمینگ با کیتوزان در سطوح ۰/۲ و ۰/۴ درصد سبب بهبود شاخص بنیه گیاهچه گردید ولی تفاوت معنی‌داری با شاهد دیده نشد. در حالی‌که افزایش سطح کیتوزان از ۰/۶ درصد سبب کاهش معنی‌دار شاخص بنیه گیاهچه شد. به‌طوری‌که پرایمینگ یک درصد کیتوزان با میزان ۱۷/۶ درصد سبب کاهش ۸۲/۷ درصدی این صفت نسبت به شاهد شد. نتایج بررسی اثر متقابل کادمیوم کیتوزان نشان داد که بیشترین شاخص بنیه گیاهچه مربوط به شرایط ۷۵۰ میکرومولار کلرید کادمیوم و پرایمینگ ۰/۴ و ۰/۲ درصد کیتوزان (۲۹/۹ درصد) و در شرایط ۷۵۰ میکرومولار کلرید کادمیوم و پرایمینگ ۰/۶ درصد کیتوزان (۲۶/۴ درصد) بود.

شاخص بنیه بذور از مهم‌ترین جنبه‌های کیفیت بذر در گیاه بوده و نشان دهنده تلاوم جوانه‌زنی و تولید گیاهچه‌های قوی و سالم است. افزایش غلظت کادمیوم سبب کاهش شاخص بنیه گیاهچه در گندم (Zaari, Jabri et al., 2024) و سویا (Liu et al., 2011) شده است. به‌طور کلی تنش کادمیوم بر شاخص بنیه گیاهچه تاثیر منفی می‌گذارد که بر اساس تحقیقات انجام‌شده این اثرات کاهشی نامطلوب را می‌توان به تجمع کادمیوم در سلول و اثرات بازدارندگی آن بر جذب و جابه‌جایی آب و مواد مغذی، اختلال در فعالیت‌های آنزیمی، اختلال در تنظیم هورمونی، اختلال و ممانعت در فرآیند تنفس و فتوسنتز، طولیل شدن نسبت داد (Radha et al., 2010).

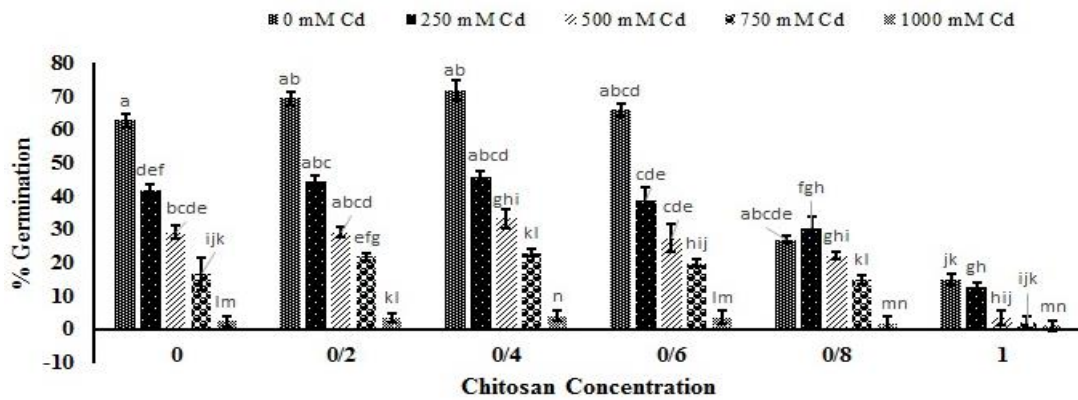
نتایج مطالعه انجام شده نشان داد که پرایمینگ بذر با کیتوزان سبب بهبود شاخص بنیه گیاهچه در سیاهدانه شده است که با نتایج برخی محققین دیگر مبنی بر بهبود این صفت در ذرت تحت تنش اسمزی (Kakar et al., 2023) و گل گاوزبان تحت تنش کادمیوم (Sheikhzadeh, 2020) مطابقت داشت. علت افزایش این صفت تحت پرایمینگ ممکن است به‌دلیل شروع رویدادهای متابولیکی در دانه‌های پرایم‌شده مانند حرکت ذخایر غذایی، فعالیت و سنتز مجدد بعضی آنزیم‌ها، شروع سنتز مجدد RNA و DNA باشد. دلیل احتمالی دیگر رشد سریع جنین به‌دنبال برطرف شدن موانع جوانه‌زنی پس از پرایمینگ باشد (Basra et al., 2003).

جدول ۱- تجزیه واریانس اثر پرایمینگ سطوح کیتوزان و کادمیوم بر صفات جوانه‌زنی و بیوشیمیایی سیاهدانه  
Table 1. Analysis of variance of effect of chitosan priming and cadmium stress on germination and biochemical characteristics Black seed

منابع تغییرات S.O.V	درجه آزادی df	درصد جوانه‌زنی % Germination	سرعت جوانه‌زنی Germination Rate	شاخص بینه Seed Germination Index	طول ریشه‌چه Root Length	طول ساقچه Shoot Length	کاتالاز Catalase	پراکسیداز Peroxidase	قند محلول Soluble Sugar	پروتین Prolin	فنل Phenol
کیتوزان	5	+9.31	+1209.56	+65.54	-572.92	-456.51	-102.39	-269.86	-10.32	-42.14	-0.76
کادمیوم	4	+12.54	+1917.24	-1733.27	-1975.38	-971.41	-26.11	-565.03	-7.61	-62.61	-3.28
کیتوزان × کادمیوم Ch×Cd	20	+14.87	+51.37	+71.91	+75.03	+41.29	-55.59	-75.41	-7.57	-63.82	-2.59
خطا Error	90	9.16	1.32	9.77	4.27	2.02	4.51	8.04	0.009	45.58	2.04
CV		5.44	6.2	6.2	9.44	25	7.7	11.1	9.3	9.1	9.3

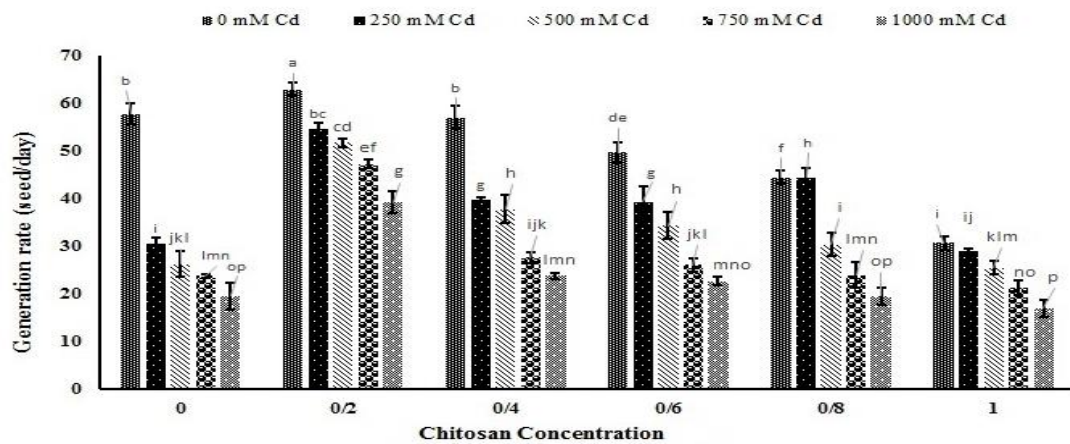
\* و \*\* به ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال پنج و یک درصد است

\* and \*\*: significant at the 5 and 1% probability level, respectively



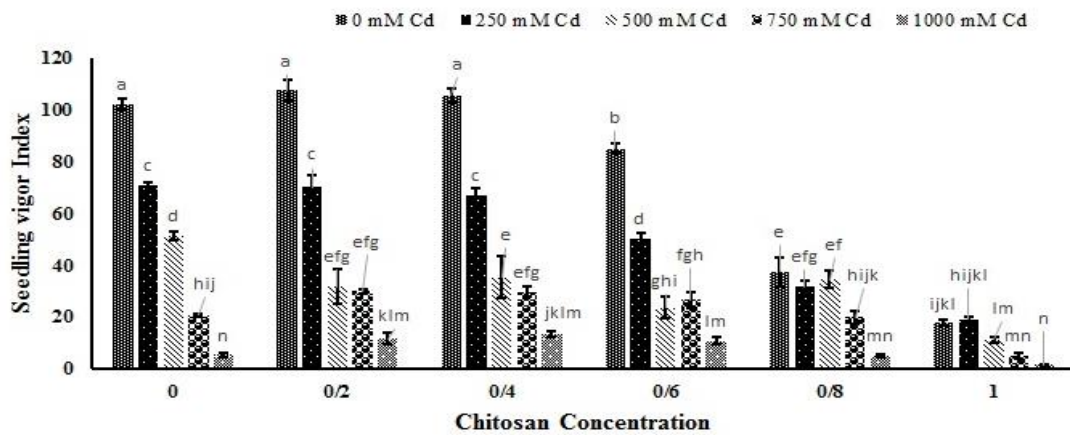
شکل ۱- تاثیر پرایمینگ کیتوزان بر شاخص درصد جوانه‌زنی گیاه سیاهدانه تحت تنش کلرید کادمیوم. حروف نامشابه نشان‌دهنده اختلاف معنی‌داری در سطح ۵٪ آزمون LSD می‌باشد

Figure 1. The effect of chitosan priming on germination percentage traits under colored cadmium stress. Unlike letters indicate a significant difference at the 5% level of the LSD test.



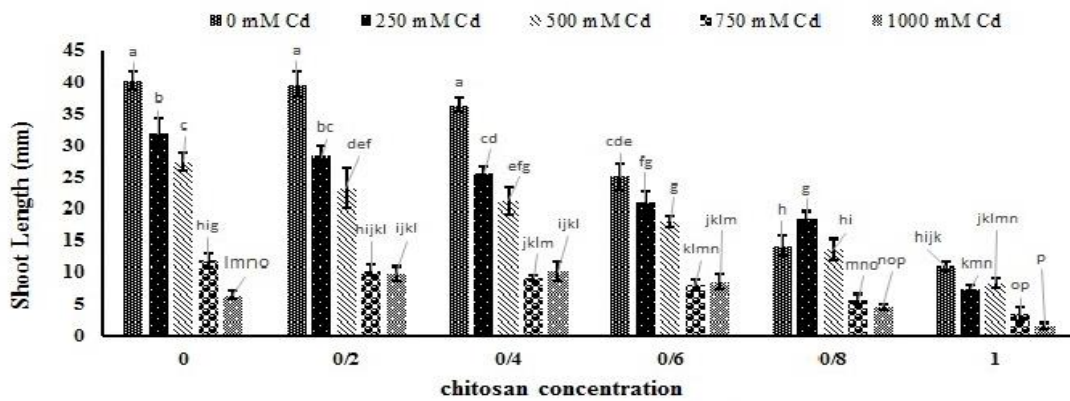
شکل ۲- تاثیر پرایمینگ کیتوزان بر سرعت جوانه‌زنی گیاه سیاهدانه تحت تنش کلرید کادمیوم. حروف نامشابه نشان‌دهنده اختلاف معنی‌داری در سطح ۵٪ آزمون LSD می‌باشد

Figure 2. The effect of chitosan priming on germination rate traits under colored cadmium stress. Unlike letters indicate a significant difference at the 5% level of the LSD test.



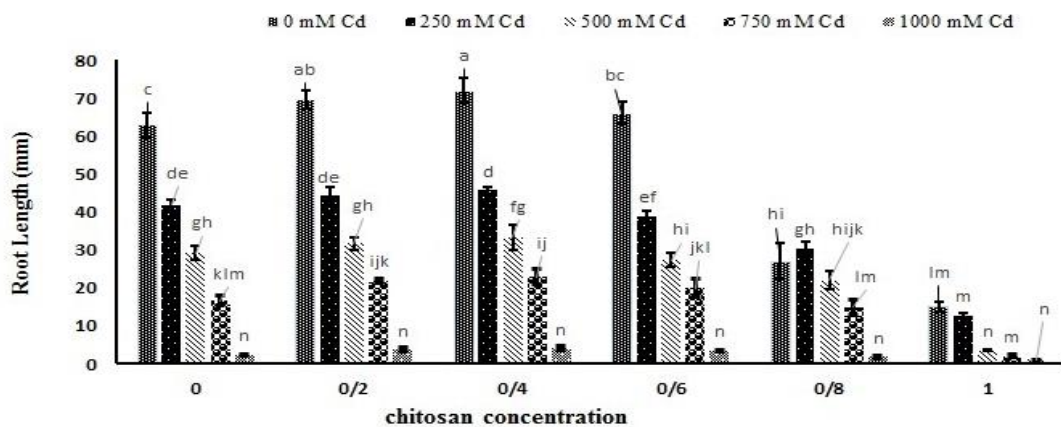
شکل ۳- تاثیر پرایمینگ کیتوزان بر شاخص بنیه گیاه سیاهدانه تحت تنش کلریدکادمیوم. حروف نامشابه نشان دهنده اختلاف معنی داری در سطح ۵٪ آزمون LSD می باشد

Figure 3. The effect of chitosan priming on seedling vigor index traits under colored cadmium stress. Unlike letters indicate a significant difference at the 5% level of the LSD test.



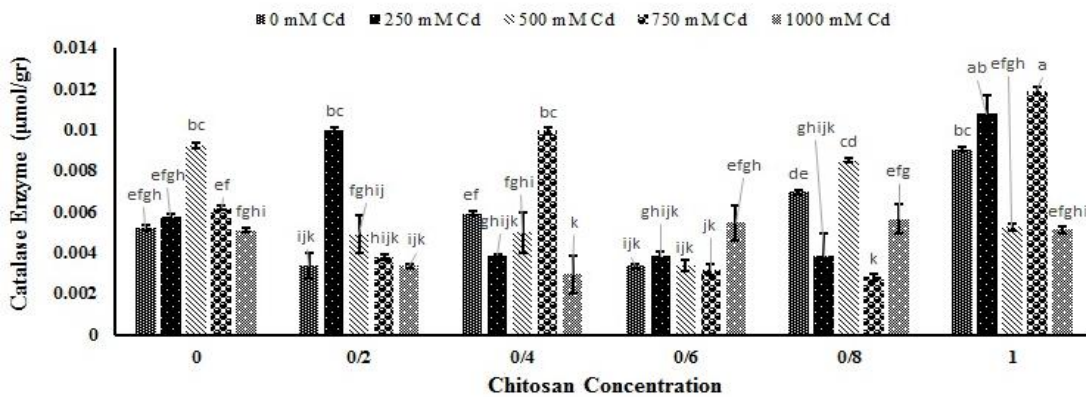
شکل ۴- تاثیر پرایمینگ کیتوزان بر شاخص طول ساقه گیاه سیاهدانه تحت تنش کلریدکادمیوم. حروف نامشابه نشان دهنده اختلاف معنی داری در سطح ۵٪ آزمون LSD می باشد

Figure 4. The effect of chitosan priming on shoot length traits under colored cadmium stress. Unlike letters indicate a significant difference at the 5% level of the LSD test.



شکل ۵- تاثیر پرایمینگ کیتوزان بر طول ریشه گیاه سیاهدانه تحت تنش کلریدکادمیوم. حروف نامشابه نشان دهنده اختلاف معنی داری در سطح ۵٪ آزمون LSD می باشد

Figure 5. The effect of chitosan priming on Root length traits under colored cadmium stress. Unlike letters indicate a significant difference at the 5% level of the LSD test.



شکل ۶- تاثیر پرایمینگ کیتوزان بر میزان محتوی آنزیم کاتالاز در گیاه سیاهدانه تحت تنش کلرید کادمیوم. حروف نامشابه نشان دهنده اختلاف معنی داری در سطح ۵٪ آزمون LSD می‌باشد

Figure 6. The effect of chitosan priming on catalase enzyme under colored cadmium stress. Unlike letters indicate a significant difference at the 5% level of the LSD test.

نشان داد که پیش تیمار کیتوزان تنها در غلظت‌های ۰/۰۵ تا ۰/۴ درصد سبب بهبود جوانه‌زنی گردید (Mahdavi et al., 2013). مهدی پور و همکاران (Mahdipour et al., 2022) نیز با بررسی پارامترهای رشدی در گیاه سیاهدانه تحت تیمار با کیتوزان با غلظت‌های (۰/۰۱، ۰/۰۵، ۰/۲، ۰/۴ و ۱ درصد) نشان دادند که تیمار ۰/۰۱ تا ۱ درصد کیتوزان سبب افزایش پارامترهای رشد و جوانه‌زنی شدند. در حالی که پرایمینگ در غلظت بالای چهار درصد سبب روند کاهشی پارامترهای رشد و جوانه‌زنی شد که در تطابق با نتایج این مطالعه بود. در مجموع نتایج این پژوهش بیان داشت که غلظت یا دفعات زیاد محلول پاشی نه تنها موجب بهبود تأثیر نمی‌شود، بلکه می‌تواند اثرات منفی نیز به همراه داشته باشد (Ranjbar et al., 2017).

#### آنزیم کاتالاز

نتایج مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که بیشترین میزان آنزیم کاتالاز مربوط به تیمار ۵۰۰ میکرومولار کلرید کادمیوم (۰/۰۹۲ میکرومول بر گرم بافت تازه) با افزایش ۷۷ درصد نسبت به شاهد و بعد از آن مربوط به تیمار ۷۵۰ میکرومولار کلرید کادمیوم (۰/۰۶۱ میکرومول بر گرم بافت تازه) بود (شکل ۶). پرایمینگ با کیتوزان در تیمار ۰/۸ درصد کیتوزان با میزان ۰/۰۶۹ میکروگرم در گرم وزن تر و تیمار ۰/۴ درصد کیتوزان با میزان ۰/۰۵۹ میکروگرم در گرم وزن تر به ترتیب سبب افزایش ۳۲/۶ و ۱۳ درصدی این صفت نسبت به شاهد شدند. نتایج مقایسه میانگین آنزیم کاتالاز تحت برهم‌کنش پرایمینگ کیتوزان و کادمیوم حاکی از تأثیر کیتوزان در افزایش کاتالاز در تنش کادمیوم بود. بیشترین میزان کاتالاز در شرایط ۲۵۰ میکرومولار کلرید کادمیوم و پرایمینگ ۰/۲ و یک درصد کیتوزان (۰/۰۱ میکرومول بر گرم بافت تازه) و در شرایط ۷۵۰ میکرومولار کلرید کادمیوم مربوط به پرایمینگ ۰/۴ و یک درصد کیتوزان (۰/۰۱ میکرومول بر گرم بافت تازه) بود.

همان‌طور که اشاره شد، تجمع کادمیوم منجر به اثرات سمی مختلف در گیاهان (سطوح رشد، بیوشیمیایی، فیزیولوژیکی و مولکولی) می‌شود لذا برای اجتناب و یا تحمل تنش مکانیسم‌های سم‌زدایی از طریق مسیرهای سیگنالینگ مختلف (مانند تولید بیش از حد گونه‌های اکسیژن فعال (ROS) و سنتز فیتوهورمون) در گیاهان در طول قرار گرفتن در معرض کادمیوم فعال می‌شود (Ghosh & Roy, 2019). افزایش رادیکال‌های آزاد به‌عنوان سیگنال مولکولی سبب افزایش آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت مانند CAT و POD در گیاه می‌گردد (Asad et al.,

براساس نتایج به‌دست‌آمده در این مطالعه با افزایش غلظت کادمیوم، طول ریشه و ساقچه در سیاهدانه کاهش یافت که با نتایج محققین در گیاه *Brassica Juncea* (Mohamed et al., 2012) و گندم (Tavakoli Hasanaklo et al., 2015) تحت تنش کادمیوم مطابقت داشت. همچنین بررسی پارامترهای جوانه‌زنی در برخی گیاهان دارویی بهاره از قبیل خرفه، سیاهدانه، شنبلله، شوید، ریحان، زنبان نشان داد که غلظت کم کادمیوم باعث تحریک رشد گیاهچه شد ولی در تمام گیاهان غلظت بالای ۳۰ میلی‌گرم بر لیتر باعث کاهش طول ریشه‌چه، طول ساقچه‌چه، وزن خشک ریشه‌چه و ساقچه‌چه و بنیه بذر گردید (Fallah et al., 2018). مهار رشد گیاهان توسط فلزات سنگین ممکن است به‌علت تأثیر فلزات سنگین بر چرخه تقسیم سلولی باشد که سبب افزایش زمان چرخه سلولی و کاهش شاخص میتوزی می‌شوند (Radha et al., 2010). از سویی بیشترین اثر سمیت کادمیوم بر طول ریشه‌چه و سپس بر طول ساقچه‌چه سیاهدانه دیده شد. از آن‌جا که ریشه گیاه در تماس مستقیم با کادمیوم می‌باشد، ممانعت از طول شدن طول ریشه‌چه به‌راحتی قابل مشاهده است (Zhou et al., 2002). لذا در مطالعه پاسخ‌های تنش غیرزیستی گیاهی داده‌های مربوط به ریشه از اهمیت بالایی برخوردار است، زیرا آن‌ها نشانه اصلی قرار گرفتن گیاهان در معرض عوامل تنش‌زا هستند. نتایج مطالعات آیسیک و همکاران (Aycicek et al., 2008) نیز حاکی از وجود اثرات کاهشی و معنی‌دار کادمیوم بر ریشه‌چه آفتابگردان بود که تأییدکننده نتایج این پژوهش بود. استفاده از کیتوزان برای پرایمینگ بذر سیاهدانه اثر مثبتی بر افزایش طول ریشه‌چه و گیاهچه داشت، افزایش طول گیاهچه تحت پرایمینگ می‌تواند به‌دلیل نقش کیتوزان در افزایش فعالیت آنزیم‌های هیدرولیزکننده باشد که از یک طرف سبب تجزیه مواد آندوسپرمی و انتقال فرآورده‌های متابولیکی شده و از جهت دیگر سبب تضعیف دیواره سلولی و بهبود ظهور ریشه‌چه می‌گردد (Abdallah et al., 2020). علاوه بر این چنین بهبودی ممکن است به‌دلیل جذب بالای آب و مواد مغذی ناشی از تنظیم اسمزی بهتر سلولی و افزایش فعالیت آنزیم‌های مهارکننده توسط کیتوزان باشد (Guan et al., 2009).

همچنین نتایج این مطالعه نشان داد که با افزایش غلظت کادمیوم، جوانه‌زنی و پارامترهای رشدی به‌طور معنی‌داری کاهش یافت. نتایج محققین در بررسی اثر غلظت‌های مختلف کیتوزان (۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۲، ۰/۴، ۰/۵، ۰/۲، ۱، ۲، ۳ درصد) بر روی جوانه‌زنی گلرنگ تحت تنش کم‌آبی

پرایمینگ با کیتوزان تأثیر مثبت و بهبود دهنده‌ای بر افزایش سطح فعالیت آنزیم پراکسیداز داشت. به نظر می‌رسد افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی CAT و POD در سیاهدانه پرایمینگ شده به دلیل اثر تحریک‌کنندگی کیتوزان بر ژن‌های درگیر در بیوسنتز آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی باشد. به‌طور کلی، کیتوزان از طریق افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت و جاروب ROS، باعث مقاومت گیاه در مقابل تنش‌ها و تحریک رشد گیاه می‌شود (Aghighi Shahverdi *et al.*, 2017). نوری و همکاران (Noori *et al.*, 2022) با مطالعه روی گیاه زیره نشان دادند پرایمینگ با کیتوزان فعالیت آنزیم POD را در تمام سطوح اسمزی در مقایسه با بذره‌های غیر پرایمینگ شده بهبود بخشیده‌است. مهدوی و همکاران (Mahdavi *et al.*, 2013) در بررسی اثر غلظت‌های مختلف کیتوزان در گلرنگ گزارش دادند که غلظت‌های ۰/۰۵ تا ۰/۴ درصد کیتوزان سبب افزایش محتوی پروتئین و فعالیت آنزیم کاتالاز در گیاهچه گلرنگ شد.

#### محتوی قند محلول

مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که تنش کادمیوم سبب افزایش محتوی قند محلول نسبت به شاهد شد. به‌طوری‌که بیشترین محتوی قند محلول (۰/۹۲ میکروگرم در گرم وزن تر) در کادمیوم ۲۵۰ میکرومولار حاصل شد که بیانگر افزایش ۵۰/۸ درصدی این صفت بود (شکل ۸). بعد آن بیشترین محتوی قند محلول (۰/۸۴ میکروگرم در گرم وزن تر) در تیمار ۷۵۰ میکرومولار کادمیوم حاصل شد که بیانگر افزایش ۳۷/۷ درصدی این صفت نسبت به شاهد بود. در تیمار پرایمینگ با کیتوزان در سطوح ۰/۲، ۰/۴ و ۰/۶ درصد تفاوت معنی‌داری با شاهد برای محتوی قند محلول دیده نشد. ولی پرایمینگ در تیمار ۰/۸ درصد کیتوزان با میزان ۰/۹۷ میکروگرم در گرم وزن تر و تیمار یک درصد کیتوزان با میزان ۰/۸۹ میکروگرم در گرم وزن تر به ترتیب سبب افزایش ۵۷ و ۴۵ درصدی این صفت نسبت به شاهد شدند. نتایج برهم‌کنش کادمیوم کیتوزان نشان داد که پرایمینگ کیتوزان در تمامی چهار سطح سبب افزایش محتوی قند محلول در تنش ۱۰۰۰ میکرومولار کلرید کادمیوم شد. به‌طوری‌که بیشترین محتوی قند محلول مربوط به شرایط ۱۰۰۰ میکرومولار کلرید کادمیوم در پرایمینگ ۰/۸ درصد کیتوزان (۰/۷۲ میکروگرم در گرم وزن تر) و در پرایمینگ ۰/۴ درصد کیتوزان (۰/۶۶ میکروگرم در گرم وزن تر) بود.

مطالعات نشان می‌دهد که تنش کادمیوم سبب تغییرات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی در گیاهان می‌گردد که شایع‌ترین تغییرات شامل تغییرات در محتوای پروتئین، مالون دی‌آلدئید، قند محلول، پروتئین‌ها و فعالیت آنزیم است. این تغییر به دلیل تولید بیش از حد رادیکال‌های آزاد، مهار آنزیم‌ها و یا کمبود موادمغذی است (Hasanuzzaman *et al.*, 2018). در مطالعه حاضر نیز تنش کادمیوم سبب افزایش محتوی قند محلول در سیاهدانه گردید که با نتایج وانگ و همکاران (Wang *et al.*, 2024) در گیاه *Pinus massoniana* و کوی و همکاران (Cui *et al.*, 2021) در گیاه *Spathiphyllum* مطابقت داشت. در کل افزایش محتوی قند ممکن است به این دلیل رخ داده باشد که در مراحل اولیه تنش فلزات سنگین، گیاهان از مکانیزم مقاومت داخلی استفاده می‌کنند که می‌تواند باعث افزایش پروتئین محلول و قند محلول شود (Wang *et al.*, 2024).

بر اساس نتایج مطالعه حاضر محتوی قند محلول در گیاهان پرایمینگ‌شده با کیتوزان نسبت به گیاهان غیرپرایمینگ شده بیشتر می‌باشد که با تحقیقات انجام گرفته در گیاهان مختلف مطابقت دارد

(2019). همکاری این آنزیم‌های محافظ می‌تواند ROS را از بین ببرد و هموستازی را بین تولید و تخریب ROS حفظ کرده و سطح رادیکال‌های آزاد را کاهش دهد. در نهایت، آسیب به سلول‌ها می‌تواند کاهش یا اجتناب یابد. کاتالاز یک آنزیم آنتی‌اکسیدانی است که با تجزیه پراکسید هیدروژن به آب و اکسیژن از تجمع پراکسید در اندامک‌ها و بافت‌های سلولی و از آسیب‌های ناشی از آن محافظت می‌کند (Asada, 2006). بر اساس نتایج این مطالعه تنش کادمیوم به میزان ۵۰۰ میکرومولار سبب افزایش میزان فعالیت کاتالاز شده در حالی که با افزایش بیشتر دز کادمیوم فعالیت این آنزیم کاهش یافت. به نظر می‌رسد غلظت‌های زیاد فلزات فعال چون کادمیوم منجر به تخریب ساختارهای پروتئینی و آنزیمی در سلول شده و از نظر اکسیداسیون و احیا منجر به کاهش میزان فعالیت‌های آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی می‌گردد (Sheikhzadeh, 2020). از سوی بررسی روند کاهش میزان فعالیت آنزیم همراه با افزایش دز تنش چنین استنباط می‌گردد که قابلیت گیاهان برای افزایش محافظت آنتی‌اکسیداسیونی برای مقابله با پیامدهای منفی تنش فلزات سنگین محدود می‌باشد (Schutzendubel & Polla, 2002).

نتایج تحقیق حاضر نشان داد که پرایمینگ با کیتوزان سطح فعالیت آنزیم کاتالاز را نسبت به شاهد تحت تنش افزایش داد تا اثرات سوء حاصل از تنش کادمیوم را محدود نماید که با نتایج تحقیقات دیگر هم‌خوانی دارد (Mahdavi *et al.*, 2013; Caruso *et al.*, 2009). علت افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان پس از پرایمینگ و تحت تنش محیطی می‌تواند به دلیل بهبود و تسریع در ساخت DNA در بافت جنینی در مدت پرایمینگ باشد (Moosavi *et al.*, 2009).

#### آنزیم پراکسیداز

با افزایش غلظت کادمیوم، فعالیت آنزیم پراکسیداز به‌طور معنی‌داری افزایش یافت به‌طوری‌که بیشترین میزان این آنزیم در سطح ۷۵۰ میکرومولار کلرید کادمیوم (۰/۰۵۳ میکرومول بر گرم بافت تازه) و ۵۰۰ میکرومولار کلرید کادمیوم (۰/۰۰۵ میکرومول بر گرم بافت تازه) مشاهده شد (شکل ۷). در بین تیمارهای مربوط به پرایمینگ کیتوزان بیشترین میزان آنزیم پراکسیداز (۰/۰۳۶ میکرومول بر گرم بافت تازه) مربوط به تیمار ۰/۴ درصد کیتوزان بود که حدود ۱۱۱ درصد نسبت به شاهد بیشتر بود و پس از آن تیمار ۰/۸ درصد کیتوزان (۰/۰۲۶ میکرومول بر گرم بافت تازه) بیشترین میزان آنزیم را داشتند. نتایج مقایسه میانگین آنزیم پراکسیداز تحت برهم‌کنش پرایمینگ کیتوزان و کادمیوم نشان داد که بیشترین میزان این آنزیم در شرایط ۵۰۰ میکرومولار کلرید کادمیوم مربوط به پرایمینگ ۰/۴ درصد کیتوزان (۰/۰۸۳ میکرومول بر گرم بافت تازه) و در شرایط ۷۵۰ میکرومولار کلرید کادمیوم مربوط به پرایمینگ ۰/۲ درصد کیتوزان (۰/۰۸۲ میکرومول بر گرم بافت تازه) و در شرایط ۷۵۰ میکرومولار کلرید کادمیوم مربوط به پرایمینگ ۰/۴ درصد کیتوزان (۰/۰۷۱ میکرومول بر گرم بافت تازه) و در شرایط ۵۰۰ میکرومولار کلرید کادمیوم مربوط به پرایمینگ یک درصد کیتوزان (۰/۰۶۱ میکرومول بر گرم بافت تازه) بود.

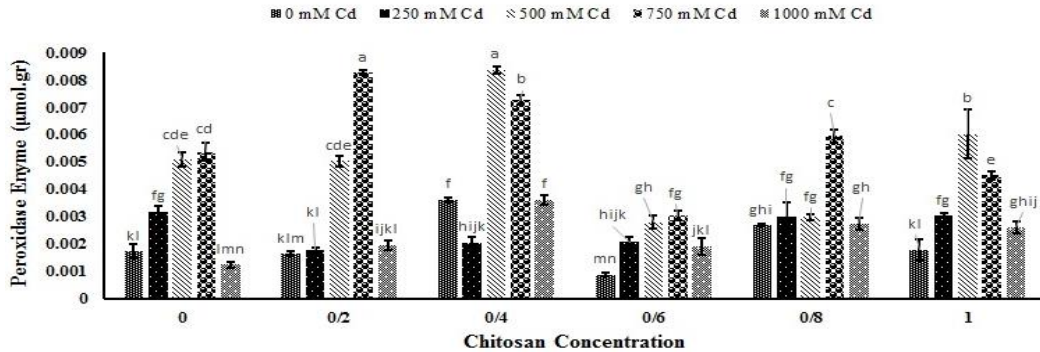
افزایش غلظت کادمیوم سبب افزایش فعالیت آنزیم پراکسیداز در غلظت‌های ۷۵۰ و ۵۰۰ میکرومولار کادمیوم شده‌است. آنزیم POD با مهار انواع اکسیژن فعال از جمله  $H_2O_2$  سبب کنترل تنش در سیاهدانه می‌گردد (Zahang *et al.*, 2009). نتایج همچنین نشان داد که با افزایش سطح تنش (۱۰۰۰ میکرومولار کادمیوم) سطح فعالیت POD کاهش یافت که این می‌تواند بیانگر آستانه تحمل سیاهدانه در برخورد با این سطح از تنش باشد (Schutzendubel & Polla, 2002).

دادند (شکل ۹). پرایمینگ کیتوزان سبب روند افزایشی میزان تولید پرولین شد به‌طوری‌که تیمار ۰/۸ درصد با میزان ۶۹/۶ میکروگرم در گرم وزن تر و تیمار ۰/۶ درصد کیتوزان با میزان ۶۷/۵ میکروگرم در گرم وزن تر به‌ترتیب سبب افزایش ۷۹/۷ و ۷۴/۲ درصدی این صفت نسبت به شاهد شدند. نتایج بررسی فعالیت آنزیم پرولین در اثر متقابل پرایمینگ کیتوزان و کادمیوم نشان داد که در پرایمینگ ۰/۲ درصد کیتوزان و آلودگی ۵۰۰ میکرومولار کلرید کادمیوم بیشترین فعالیت پرولین (۸۷/۲۲ میکرومول بر گرم بافت تازه) مشاهده شد که این میزان ۲۵ درصد بیشتر از شاهد (بدون پرایمینگ) بود.

(Behboud *et al.*, 2020; Guan *et al.*, 2009). دلیل این افزایش نقش کیتوزان در افزایش محتوای اسمولیت‌هایی مانند پرولین و قندهای محلول در گیاه پرایم‌شده می‌باشد که به حفظ تعادل آبی و کاهش اثرات منفی تنش کادمیوم کمک می‌کند (Mamgain *et al.*, 2023).

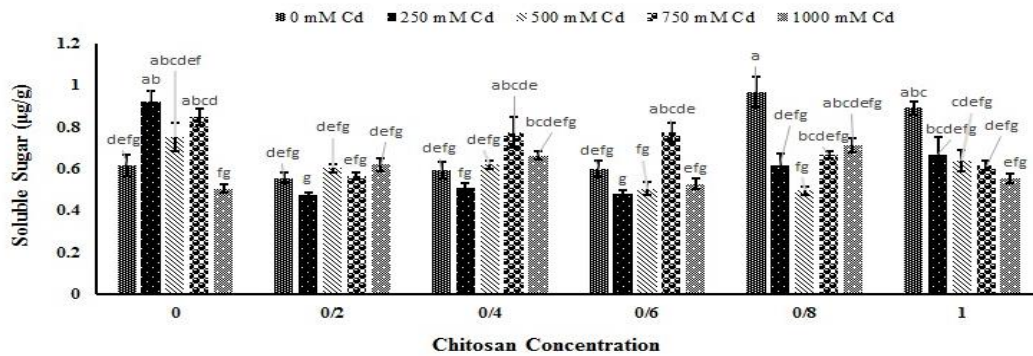
**پرولین**

افزایش غلظت کادمیوم، فعالیت پرولین را به‌طور معنی‌داری افزایش داد. به‌طوری‌که تیمار ۵۰۰ میکرومولار آلودگی با کادمیوم با ۸۷/۲۲ میکرومول بر گرم بافت تازه و تیمار ۷۵۰ میکرومولار آلودگی با کادمیوم با ۷۰/۰۷ میکرومول بر گرم بافت تازه بیشترین میزان پرولین را نشان



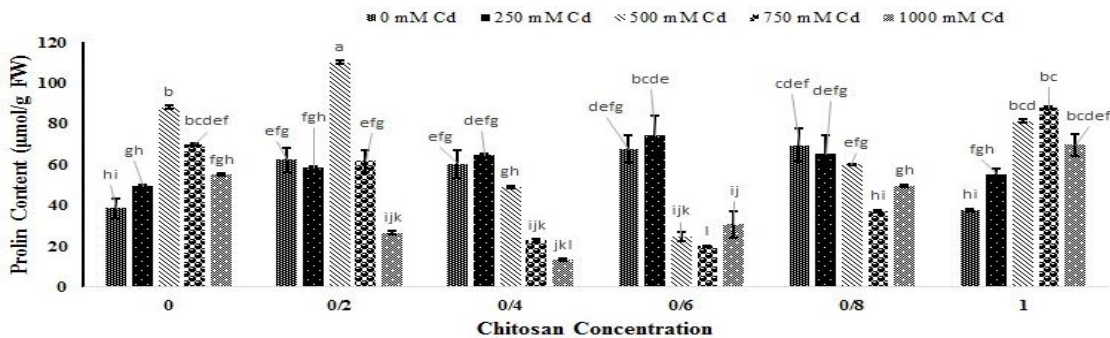
شکل ۷- تاثیر پرایمینگ با کیتوزان و کادمیوم بر میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز. حروف نامشابه نشان‌دهنده اختلاف معنی‌داری در سطح ۵٪ آزمون می‌باشد

Figure 7. Effect of priming with chitosan and cadmium on peroxidase enzyme activity. Dissimilar letters indicate a significant difference at the 5% level of the LSD test



شکل ۸- تاثیر پرایمینگ با کیتوزان و کادمیوم بر میزان فعالیت قند محلول. حروف نامشابه نشان‌دهنده اختلاف معنی‌داری در سطح ۵٪ آزمون می‌باشد

Figure 8. The effect of priming with chitosan and cadmium on the amount of soluble sugar activity. Dissimilar letters indicate a significant difference at the 5% level of the LSD test



شکل ۹- تاثیر پرایمینگ با کیتوزان و کادمیوم بر میزان فعالیت آنزیم پرولین. حروف نامشابه نشان‌دهنده اختلاف معنی‌داری در سطح ۵٪ آزمون می‌باشد.

Figure 9. The effect of priming with chitosan and cadmium on the activity of proline enzyme. Dissimilar letters indicate a significant difference at the 5% level of the LSD test.

آویشن‌های پراریم شده با کیتوزان پرولین بالایی را نسبت به گیاهان غیرپراریم شده نشان دادند که در تأیید نتایج این مطالعه بود.

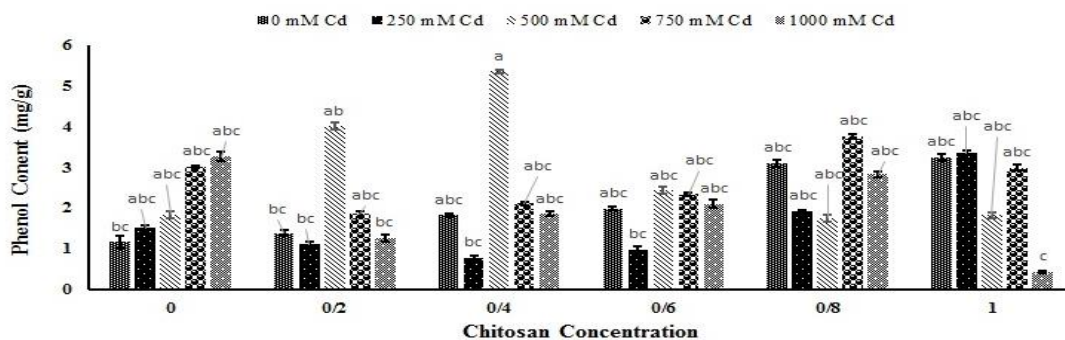
### محتوی فنل

افزایش غلظت کلریدکادمیوم سبب افزایش محتوی فنل شد. به‌طوری که تیمار ۱۰۰۰ میکرومولار آلودگی با کلریدکادمیوم با میزان ۳/۲ میلی‌گرم بر گرم عصاره و تیمار ۷۵۰ میکرومولار آلودگی با کلریدکادمیوم با میزان ۳ میلی‌گرم بر گرم عصاره به‌ترتیب سبب افزایش ۱۷۷/۲ و ۱۶۰/۸ درصدی این صفت نسبت به شاهد شدند (شکل ۱۰). پراریمینگ کیتوزان سبب افزایش محتوی فنل گردید به‌طوری که تیمار پراریمینگ با غلظت ۰/۸ کیتوزان با میزان ۳/۲ میلی‌گرم بر گرم عصاره و تیمار یک درصد کیتوزان با میزان ۳/۰۹ میلی‌گرم بر گرم عصاره دارای بیشترین میزان فنل بودند. نتایج بررسی فنل در برهم‌کنش کلریدکادمیوم کیتوزان نشان داد که در پراریمینگ ۰/۴ درصد کیتوزان و آلودگی ۵۰۰ میکرومولار کادمیوم بیشترین فعالیت فنل (۵/۳۵ میلی‌گرم بر گرم عصاره) مشاهده شد که این میزان ۱۹۳/۳ درصد بیشتر از شاهد (بدون پراریمینگ) بود. بعد آن بیشترین محتوی فنل در آلودگی ۵۰۰ میکرومولار کلرید کادمیوم در پراریمینگ ۰/۲ درصد کیتوزان (۴/۰۱ میلی‌گرم بر گرم عصاره) و در آلودگی ۷۵۰ میکرومولار کلرید کادمیوم در پراریمینگ ۰/۸ درصد کیتوزان (۳/۷۵ میلی‌گرم بر گرم عصاره) بود. همچنین کمترین میزان فنل در آلودگی ۱۰۰۰ میکرومولار کلرید کادمیوم در پراریمینگ یک درصد کیتوزان (۰/۴ میلی‌گرم بر گرم عصاره) مشاهده شد.

بعد آن بیشترین محتوی پرولین در آلودگی ۱۰۰۰ میکرومولار کلریدکادمیوم در پراریمینگ یک درصد کیتوزان (۸۷/۹ میکروگرم در گرم وزن تر) و در آلودگی ۲۵۰ میکرومولار در پراریمینگ ۰/۶ درصد کیتوزان (۷۴/۳ میکروگرم در گرم وزن تر) بود.

پرولین یک پروتئین به‌شدت آب‌دوست و محافظت‌کننده حیاتی است که از طریق غیر فعال کردن ROS و کاهش پتانسیل آب، حفظ فعالیت برخی از ماکرومولکول‌های بیولوژیکی و تثبیت ساختارهای غشایی مسئول کاهش استرس در سلول‌های گیاهی است (Hidangmayum & Dwivedi, 2018). گزارش شده‌است که در مواجهه با کادمیوم، محتوی پرولین در گونه‌های مختلف گیاهی از جمله خیار (Semida et al., 2018) سیاهدانه (Fallah et al., 2018) و لویا (Rady et al., 2019) افزایش یافت. افزایش این پروتئین در شرایط تنش برای بسیاری از گونه‌های گیاهی، به میزان مقاومت آن‌ها در برابر تنش بستگی دارد به‌طوری که غلظت پرولین در گیاهان مقاوم بیشتر از گیاهان حساس است (Ashraf & Foolad, 2007). در مطالعه حاضر همراه با افزایش غلظت کادمیوم تا ۷۵۰ میکرومولار محتوی پرولین افزایش یافت ولی در غلظت ۱۰۰۰ میکرومولار محتوی پرولین کاهش یافت که بیانگر آستانه تحمل سیاهدانه به تنش بود.

پرولین یک متابولیت مهم برای سازگاری گیاه، حفاظت و تحمل به تنش کادمیوم است که افزایش معنی‌دار آن در سیاهدانه پراریم‌شده نسبت به گیاهان غیرپراریم شده حاکی از تأثیر مثبت و بهبود دهنده کیتوزان به‌عنوان القاکننده مقاومت به تنش کادمیوم بود. در مطالعه باغستانی و همکاران (Emami Bistgani et al., 2017) نشان داده شد که



شکل ۱۰-۱۰ تاثیر پراریمینگ با کیتوزان و کادمیوم بر میزان فعالیت فنل. حروف نامشابه نشان‌دهنده اختلاف معنی‌داری در سطح ۵٪ آزمون LSD می‌باشد.

Figure 10. The effect of priming with chitosan and cadmium on the phenol activity. Dissimilar letters indicate a significant difference at the 5% level of the LSD test.

معنی‌داری از میزان فنل در اثر تنش کادمیوم مشاهده شد (Gerami et al., 2018) که تأییدکننده نتایج این مطالعه بود.

پراریمینگ کیتوزان تأثیر بهبود دهنده‌ای در محتوی فنلی در گیاهان پراریم‌شده نسبت به گیاهان غیر پراریم‌شده داشت. طبق تحقیقات انجام‌شده پراریمینگ کیتوزان سبب افزایش محتوی فنلی در گندم (Zaari Jabri et al., 2024) و برنج (Saadat et al., 2022) شده‌است. کیتوزان به‌عنوان یک بیسیستور زیستی ممکن است دارای پتانسیل برای از بین بردن رادیکال‌های آزاد باشد که باعث افزایش میزان ترکیبات فنلی می‌شود (Naderi et al., 2014).

### نتیجه‌گیری کلی

با توجه به نتایج به‌دست‌آمده، تنش کلرید کادمیوم در تمامی سطوح به واسطه کاهش سرعت و درصد جوانه‌زنی، طول ریشه‌چه و ساقه‌چه

نقش ترکیبات فنلی مربوط به خواص اکسیداسیون احیاء آن‌ها است که نقش مهمی در حذف رادیکال‌های آزاد اکسیژن و پراکسیدازهای تجزیه‌کننده دارند. انباشتگی ترکیبات فنلی در شرایط تنشی می‌تواند به‌عنوان یک علامت عمل کند و برای راه‌اندازی زنجیره‌هایی از واکنش‌های دیگر که در نهایت به افزایش تحمل به تنش منجر می‌شود، عمل کند (Benkaci-Ali et al., 2013). در مطالعه حاضر افزایش غلظت کادمیوم سبب افزایش محتوی فنلی گردید. تبریزی و همکاران (Tabrizi et al., 2016) با بررسی تأثیر چهار تیمار کلرید کادمیوم (شاهد، ۳۰۰، ۶۰۰ و ۹۰۰ میکرومولار) بر گیاه دارویی ماریتغال گزارش کردند که محتوی فنل کل و فلاونوئیدها در سطح ۹۰۰ میکرومولار کادمیوم افزایش معنی‌داری یافت. در مطالعه دیگر در گیاه مریم‌گلی نیز افزایش

را تقلیل دهد و میزان محتوی پروتئین‌های آنتی‌اکسیدان را به‌طور قابل‌توجهی در گیاهان تحت تنش کادمیوم نسبت به گیاهان غیر پرایم‌شده افزایش دهد.

لذا بر اساس مطالعه حاضر چنین استنباط می‌شود که کاربرد کیتوزان ممکن است سبب فعال شدن چندین مکانیسم بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی در سیاهدانه شود. این نتایج نشان‌دهنده این است که استفاده از پرایمینگ بذر با کیتوزان می‌تواند به‌عنوان یک راهکار مؤثر برای افزایش تحمل سیاهدانه به تنش کادمیوم پیشنهاد و بررسی گردد.

موجب مانع از رشد گیاهچه سیاهدانه گردید. به‌طوری‌که کمترین میزان این صفات در تیمارهای ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میکرومولار کلرید کادمیوم دیده شد. علاوه بر این افزایش غلظت کادمیوم سبب افزایش میزان فعالیت آنزیم‌هایی آنتی‌اکسیدان از قبیل کاتالاز، پراکسیداز و غیرآنزیمی مانند پرولین، فنل و ترکیبات قند محلول شد. به‌طوری‌که بیشترین میزان فنل (۲/۲ میلی‌گرم بر گرم عصاره) در تیمار ۱۰۰۰ میکرومولار آلودگی با کلرید کادمیوم مشاهده شد. از سویی بررسی نتایج نشان داد که به‌کارگیری پرایمینگ بذر با کیتوزان توانست تا حدودی اثرات منفی تنش کلرید کادمیوم بر درصد و سرعت جوانه‌زنی، شاخص بنیه و طول ریشه‌چه

## References

- Abbasi Khalaki, M., Moameri, M., Asgari Lajayer, B., & Astatkie, T. (2021). Influence of nano-priming on seed germination and plant growth of forage and medicinal plants. *Plant Growth Regulation*, 93(1), 13-28. <https://doi.org/10.1007/s10725-020-00670-9>.
- Abdallah, M. M. S., Ramadan, A., El-Bassiouny, H. M. S., & Bakry, B. A. (2020) Regulation of antioxidant system in wheat cultivars by using chitosan or salicylic acid to improve growth and yield under salinity stress. *Asian Journal of Plant Science*, 19, 114-126. <https://doi.org/10.3923/ajps.2020.114.126>
- Abid, M., Hakeem, A., Shao, Y., Liu, Y., Zahoor, R., Fan, Y., Suyu, J., AtaUl-Karim, S.T., Tian, Z., Jiang, D., Snider, J.L., & Dai, T. (2018) Seed osmopriming invokes stress memory against post-germinative drought stress in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Environmental and Experimental Botany*, 145, 12-20. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2017.10.002>
- Aghighi Shahverdi, M., Omid, H., & Mousavi, S.E. (2017) Effect of chitosan on seed germination and biochemical traits of milk thistle (*Silybum marianum*) seedling under salt stress. *Iran Journal of Seed Research*, 3(2), 105-118. <https://doi.org/10.29252/yujs.3.2.105>
- Akramian, M., Hosseini, A., Kazerooni, M., & Rezvani, M.J. (2007) Effect of seed osmopriming on germination and seedling development of fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.). *Iran Journal of Field Crop Research*, 5(1), 37-46. <https://doi.org/10.22067/GSC.V5I1.894>
- Arabshahi-Delouee, S., & Urooj, A. (2007). Antioxidant properties of various solvent extracts of mulberry (*Morus indica* L.) leaves. *Food Chemistry*, 102(4), 1233-1240. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.07.013>
- Asad, S. A., Farooq, M., Afzal, A., & West, H. (2019). Integrated phytobial heavy metal remediation strategies for a sustainable clean environment—A review. *Chemosphere*, 217: 925-941. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.11.021>
- Asada K. (1999) The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. *Annual Review of Plant Biology*, 50, 601-639. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.50.1.601>
- Aycicek, M., Kaplan, O. & Yaman, M. (2008) Effect of cadmium on germination, seedling growth and metal contents of sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Asian Journal of Chemistry*, 20(4), 2663-2672.
- Balestrasse, K. B., Gallego, S.M., & Tomaro, M. L. (2004). Cadmium-induced senescence in nodules of soybean (*Glycine max* L.) plants. *Plant and Soil*, 262, 373-381. <https://doi.org/10.1023/B:PLSO.0000037056.11877.7b>
- Basra, S. M. A., Afzal, I., Anwar, S., Anwar-ul-haq, M., Shafiq, M. & Majeed, K. (2006) Alleviation of salinity stress by seed invigoration techniques in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Seed Technology*, 28, 36-46.
- Bates, S., Waldern, R. P., & Teare, E.D. (1973). Rapide determination of free proline for water stress studies. *Plant and Soli*, 39:205-207. <https://doi.org/10.1007/BF00018060>
- Behboud, R., Moradi, A., & Farajee, H. (2020) Effect of Different Chitosan Concentrations on Seed Germination and Some Biochemical Traits of Sweet Corn (*Zea mays* var. Saccharata) Seedling under Osmotic Stress Conditions. *Iran Journal of Seed Research*, 7(1), 1 <https://doi.org/10.29252/yujs.7.1.1>
- Benkaci-ali, F., Akloul, R., Boukenouche, A., & De Pauw, E. (2013) Composition of the essential oil of *Nigella sativa* seeds extracted by microwave steam distillation. *Journal of Essent Oil Bear Plant*, 16, 781-794. <https://doi.org/10.1080/0972060X.2013.813275>.
- Bermudes, G. M. A., Moreno, M, Invernizzi, R, Pla, R., & Pignata, M. L. (2010). Heavy metal pollution in topsoils near a cement plant: The role of organic matter and distance to the source to predict total and HCl-extracted heavy metal concentrations. *Chemosphere*, 78, 375-381. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.11.012>
- Caruso, G., Cavaliere, C., Foglia, P., Gubbiotti, R., Samperi, R., & Lagana, A. (2009) Analysis of drought responsive proteins in wheat (*Triticum durum*) by 2D-PAGE and MALDI-TOF mass spectrometry. *Journal of Plant Science*, 177, 570-576. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2009.08.007>
- Chance, B., & Maehly, A. C. (1995) Assay of catalases and peroxidases. *Method Enzyme*. 2, 764-775. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(55\)02300-8](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(55)02300-8)
- Choudhury, S., & Panda, S. K. (2004) Role of salicylic acid in regulating cadmium induced oxidative stress in (*Oryza sativa* L.) roots. *Bulgar Journal of Plant Physiol*, 30, 95-110.
- Cui, L., Shi, G., & Li, G. (2021) Effects of Zn and Cd on Physiological and Biochemical Characteristics, and Heavy Metal Accumulation of Landscape Plants. *Journal of Anqing Normal Univ*, 27, 79-87. <https://doi.org/10.13757/j.cnki.cn34-1328/n.2021.02.016>

- Dragicevic, V., Spasic, M., Simic, M., Dumanovic, Z., & Nikolic, B. (2013) Stimulative influence of germination and growth of maize seedlings originating from aged seeds by 2,4-D potencies. *Homeopathy*, 102(3), 179–186. <https://doi.org/10.1016/j.homp.2013.05.005>
- Ekmekci, Y., Tanyolac, D., & Ayhan, B. (2008) Effect of cadmium on antioxidant enzyme and photosynthetic activities in leaves of two maize cultivars. *Journal of Plant Physiol*, 165, 600–611. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2007.01.017>
- Emami Bistgani, Z., Siadat, S.A., Bakhshandeh, A., Ghasemi Pirbalouti, A., & Hashemi, M. (2017) Interactive effects of drought stress and chitosan application on physiological characteristics and essential oil yield of *Thymus daenensis* Celak. *Crop Journal*, 5, 407-415. <https://doi.org/10.1016/j.cj.2017.04.003>
- Naderi, S., Fakheri, B., & Esmailzadeh Bahabadi, S. (2014). Increasing of Chavicol o-Methyl Transfrase Gene Expression and Catalase and Ascorbate Peroxidase Enzymes ctivity of *Ocimum basilicum* by Chitosan. *Crop Biotechnology*, 3(3), 1-9.
- Fallah, S., Malekzadeh, S., & Pessarakli, M. (2017). Seed priming improves seedling emergence and reduces oxidative stress in *Nigella sativa* under soil moisture stress. *Journal of Plant Nutrition*, 41(1), 29-40. <https://doi.org/10.1080/01904167.2017.1381719>
- Fan, L., Zheng, S., & Wang, X. (1997). Antisense suppression of phospholipase D alpha retards abscisic acid-and ethylene-promoted senescence of postharvest Arabidopsis leaves. *The Plant Cell*, 9, 2183-2196. <https://doi.org/10.1105/tpc.9.12.2183>
- Gengmao, Z., Quanmei, S., Yu, H., Shihui, L., & Changhai, W. (2014). The physiological and biochemical responses of a medicinal plant (*Salvia miltiorrhiza* L.) to stress caused by various concentrations of NaCl. *PLoS One*, 9(2), e89624. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0089624>
- Gerami, M., Ghorbani, A., & Karimi, S. (2018) Role of salicylic acid pretreatment in alleviating cadmium-induced toxicity in *Salvia officinalis* L. *Iranian Journal of Plant Biology*, 10(1), 81-95. <https://doi.org/10.22108/IJPB.2018.108633.1069>
- Ghosh, R., & Roy, S. (2019). Cadmium toxicity in plants. In M. Hasanuzzaman, M. N. V. Prasad & K. Nahar (Eds.), *Cadmium tolerance in plants* (pp. 223–246). *Elsevier Inc.* <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-815794-7.00008-4>
- Górnik, K., Grzesik, M., & Romanowska-Duda, B. (2008). The effect of chitosan on rooting of grapevine cuttings and on subsequent plant growth under drought and temperature stress. *Journal of Fruit and Ornamental Plant Research*, 16, 333-343.
- Guan, Y. J., Hu, J., Wang, X. J., & Shao, C. X. (2009). Seed priming with chitosan improves maize germination and seedling growth in relation to physiological changes under low temperature stress. *Journal of Zhejiang University Science B*, 10, 427-433. <https://doi.org/10.1631/jzus.B0820373>
- Guilherme, M.F.S., Oliveira, H.M., & Silva, E.D. (2015). Cadmium toxicity on seed germination and seedling growth of wheat *Triticum aestivum*. *Acta Scientiarum Biol Sciences*, 37(4), 499-504. <https://doi.org/10.4025/actasciobiolsci.v37i4.28148>
- Haider, F.U., Liqun, C., Coulter, J.A., Cheema, S.A., Wu, J., Zhang, R., Wenjun, M., & Farooq, M. (2021). Cadmium toxicity in plants: impacts and remediation strategies. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 211, 111887. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111887>
- Hasanuzzaman, M., Nahar, K., & Fujita, M. (2018). Plants under metal and metalloid stress—Responses, tolerance and remediation (M. Hasanuzzaman, K. Nahar, & M. Fujita (Eds.)). *Springer Nature*. <https://doi.org/10.1007/978-981-13-2242-6>
- Hidangmayum, A., & Dwivedi, P. (2018), Plant responses to *Trichoderma spp.* and their tolerance to abiotic stresses: a review. *Journal of Pharmacogn Phytochem*, 7(1), 758–766
- Huang, G. T., Ma, S. L., Bai, L. P., Zhang, L., Ma, H., Jia, P., ... & Guo, Z. F. (2012). Signal transduction during cold, salt, and drought stresses in plants. *Molecular Biology Reports*, 39, 969-987. <https://doi.org/10.1007/s11033-011-0823-1>
- John, R., Ahmad, P., Gadgil, K., & Sharma, S. (2009). Heavy metal toxicity: Effect on plant growth, biochemical parameters and metal accumulation by *Brassica juncea* L. *International Journal of Plant Production*. 3(3),1735-8043. <https://doi.org/10.22069/IJPP.2012.653>
- Kakar, H. A., Ullah, S., Shah, W., Ali, B., Satti, S. Z., Ullah, R., & Ercisli, S. (2023). Seed priming modulates physiological and agronomic attributes of maize (*Zea mays* L.) under induced polyethylene glycol osmotic stress. *ACS omega*, 8(25), 22788-22808. <https://doi.org/10.1021/acsomega.3c01715>
- Kalai, T., Bouthour, D., Manai, J., Bettaieb Ben Kaab, L., & Gouia, H. (2016). Salicylic acid alleviates the toxicity of cadmium on seedling growth, amylases and phosphatases activity in germinating barley seeds. *Archives of Agronomy and Soil Science*, 62(6), 892-904. <http://dx.doi.org/10.1080/03650340.2015.1100295>
- Kalai, T., Khamassi, K., Teixeira da Silva, J.A., Gouia, H. & Ben-Kaab, L.B. (2014.) Cadmium and copper stress affect seedling growth and enzymatic activities in germinating barley seeds. *Archives of Agronomy and Soil Science*, 60(6), 765-783 <https://doi.org/10.1080/03650340.2013.838001>
- Kanafi Lesko Kelayeh M, Bagheri N, Babaeian Jelodar N, Ghajar Sepanlou M. (2021). Effect of Cadmium Stress on Morphophysiological Traits of Rice Seedlings. *Journal of Crop Breeding*. 13(37), 11-21. <https://doi.org/10.52547/jcb.13.37.11> [In Persian]

- Abbasi Khalaki, M., Moameri, M., Asgari Lajayer, B., & Astatkie, T. (2021). Influence of nano-priming on seed germination and plant growth of forage and medicinal plants. *Plant growth regulation*, 93(1), 13-28. <https://doi.org/10.1007/s10725-020-00670-9>.
- Khatamipour, M., Piri, E., Esmaeilian, Y., & Tavassoli, A. (2011). Toxic effect of cadmium on germination, seedling growth and proline content of Milk thistle (*Silybum marianum*). *Annals of Biological Research*, 2(5), 527-532.
- Liu, H., Zheng, Z., Han, X., Zhang, C., Li, H., & Wu, M. (2022). Chitosan Soaking Improves Seed Germination of Platycodon Grandiflorus and Enhances Its Growth, Photosynthesis, Resistance, Yield, and Quality. *Horticulturae*, 8(10), 943. <https://doi.org/10.3390/horticulturae8100943>
- Liu, T. T., Wu, P., Wang, L. H., & Zhou, Q. (2011). Response of soybean seed germination to cadmium and acid rain. *Biological Trace Element Research*, 144, 1186-1196. <https://doi.org/10.1007/s12011-011-9053-6>
- Madadi, M., Khomari, S., Javadi, A., & Sofalian, O. (2016). Effect of black cumin seed priming with calcium nitrate and nano-zinc oxide on germinability and seedling growth under salinity stress. *Journal of Plant Process and Function*, 5(15), 169-171. <https://doi.org/20.1001.1.23222727.1395.5.15.14.7>
- Mahdavi Betoul, S. A. M., Agha Alikhani, M., & Sharif M. (2013). The effect of different concentrations of chitosan on seed germination and antioxidant enzymes of safflower (*Carthamus tinctorius* L.) under water stress conditions. *Journal of Plant Research*, 26(3), 352-365. <https://doi.org/20.1001.1.23832592.1392.26.3.12.7>
- Mahdipour, F., Saadatmand, S., Iranbakhsh, A., Norozi, B., & Ardebili, Z.O. (2022). Study of the effect of the chitosan and chitosan nanoparticles on some physiological and phytochemical features of *Nigella sativa* L. *Eco - phytochem Med Plant*, 10(2), 96-113.
- Mamgain, J., Mujib, A., Bansal, Y., Gulzar, B., Zafar, N., Syeed, R., & Dewir, Y. H. (2023). Elicitation induced  $\alpha$ -amyrin synthesis in tylophora indica in vitro cultures and comparative phytochemical analyses of in vivo and micropropagated plants. *Plants*, 13(1), 122. <https://doi.org/10.3390/plants13010122>
- Menon, P., Joshi, N., & Joshi, A. (2016). Effect of heavy metals on seed germination of *Trigonella foenum-graceum* L. *International Journal of Life-Sciences Scientific Research*, 2(4), 488-493. <https://doi.org/10.21276/ijlssr.2016.2.4.27>
- Miller, T. R., & Chapman, S. R. (1978). Germination responses of three forage grasses to different concentrations of six salts. *Rangeland Ecology & Management/Journal of Range Management Archives*, 31(2), 123-124. <https://doi.org/10.2307/3897659>
- Mohamed, A. A., Castagna, A., Ranieri, A., & di Toppi, L. S. (2012). Cadmium tolerance in Brassica juncea roots and shoots is affected by antioxidant status and phytochelatin biosynthesis. *Plant Physiology and Biochemistry*, 57, 15-22. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2012.05.002>.
- Moosavi, A., Tavakkol-Afshari, R., Sharif-Zadeh, F., & Ayneband, A. (2009). Effect of seed priming on germination characteristics, polyphenoloxidase, and peroxidase activities of four amaranth cultivars. *Journal of Food, Agriculture and Environment*, 7(3-4), 353-358. <https://doi.org/>
- Naderi, S., Fakheri, B. A., & Bahrami, M. (2014). Effect of chitosan on some physiological and biochemical indices of (*Carum copticum* L.). *Agricultural Research in the Arid Areas*, 1(2), 187-201 <https://doi.org/10.22034/CSRAR.01.01.05>
- Noori, H., Moosavi, S. G., Seghatoleslami, M., & Rostampour, M. F. (2022). Responses of cumin (*Cuminum cyminum* L.) to different seed priming methods under osmotic stress. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 50(1), 12600-12600. <https://doi.org/10.15835/nbha50112600>
- Pagter, M., Bragato, C., Malagoli, M., & Brix, H. (2009). Osmotic and ionic effects of NaCl and Na2SO4 salinity on *Phragmites australis*. *Aquatic Botany*, 90(1), 43-51. <https://doi.org/10.1016/j.aquabot.2008.05.005>
- Perveen, S., Shahbaz, M., Iqbal, M., Akram, M. S., Parveen, A., & Ali, H. M. M. (2016). Induction of cadmium stress tolerance in *Triticum aestivum* L. by alfalfa leaf extract. *Applied Ecology and Environmental Research*, 14, 121-136. <https://doi.org/10.1007/s00299-015-1784-y>
- Radha, J., Srivastava, S., Solomon, S., Shrivastava, A. K. & Chandra, A. (2010). Impact of excess zinc on growth parameters cell division, nutrient accumulation, photosynthetic pigments and oxidative stress of sugarcane (*Saccharum spp*). *Acta Physio Plant*, 32: 979-986. <https://doi.org/10.1007/s11738-010-0487-9>
- Rady, M. M., Elrys, A. S., El-Maati, M. F. A., & Desoky, E. S. M. (2019). Interplaying roles of silicon and proline effectively improve salt and cadmium stress tolerance in Phaseolus vulgaris plant. *Plant Physiology and Biochemistry*, 139, 558-568. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2019.04.025>
- Rahneshan, M., Taliei, F., Ahangar, L., Sabouri, H., & Kia, S. (2019). Effect of Chitosan on the Expression Pattern of Some Pathogenecity Related Genes in Wheat Infected with Powdery Mildew. *Journal of Crop Breeding*, 11(32), 124-132. [In Persian] <https://doi.org/10.29252/jcb.11.32.124>

- Rahnesan, M., Taliei, F., Ahangar, L., Sabouri, H., & Kia, S. (2019). Effect of Chitosan on the Expression Pattern of Some Pathogenecity Related Genes in Wheat Infected with Powdery Mildew. *Journal of Crop Breeding*, 11(32), 124-132. [In Persian] <https://doi.org/10.29252/jcb.11.32.124>
- Rahoui, S., Chaoui, A., & El Ferjani, E. (2010). Membrane damage and solute leakage from germinating pea seed under cadmium stress. *Journal of hazardous materials*, 178(1-3), 1128-1131. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2010.01.115>
- Rahoui, S., Chaoui, A., Ben, C., Rickauer, M., Gentzbittel, L., & El Ferjani, E. (2015). Effect of cadmium pollution on mobilization of embryo reserves in seedlings of six contrasted *Medicago truncatula* lines. *Phytochemistry*, 111, 98-106. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2014.12.002>
- Rodriguez, J. A., Nanos, N., Grau, J. M., Gil, L., & Lopez-Arias, M. (2008). Multiscale analysis of heavy metal contents in Spanish agricultural topsoils. *Chemosphere*, 70(6), 1085-1096. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2007.07.056>
- Schieber, M. & Chandel, N.S. (2014) ROS function in redox signaling and oxidative stress. *Current biology*, 19(24), 453-462. Doi: 10.1016/j.cub.2014.03.034. PMID: 24845678; PMCID: PMC4055301. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2014.03.034>
- Schutzendubel, A., & Polle, A. (2002). Plant responses to abiotic stresses: heavy metal-induced oxidative stress and protection by mycorrhization. *Journal of experimental botany*, 53(372), 1351-1365. <https://doi.org/10.1093/jexbot/53.372.1351>
- Sedghi, M., Nemati, A., & Esmailpour, B. (2010). Effect of seed priming on germination and seedling growth of two medicinal plants under salinity. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 22(2), 130. <https://doi.org/10.9755/ejfa.v22i2.4900>
- Shao, C., Hu, J., Song, W. & Hu, W.J. (2005) Effects of seed priming with chitosan solutions of different acidity on seed germination and physiological characteristics of maize seedling. *Journal of Agriculture & Life Sciences*, 31(6), 705-708. <https://doi.org/10.5555/20053221241>
- Sheikhzadeh, P., Zare, N., & Abootalebi, S. (2022). The effect of cadmium stress on photosynthetic pigments and secondary metabolites in borage (*Borago officinalis* L.). *Environmental Stresses in Crop Sciences*, 15(4), 1143-1160. <https://doi.org/10.22077/escs.2021.4245.1996>
- Spanany, A., & Fallah, S. (2016). The effect of cadmium stress on seeds germination characteristics of some medicinal plants under in vitro conditions. *Iran Journal of Med Arom Plant*, 32(3), 527-542. <https://doi.org/10.22092/ijmapr.2016.106833>
- Tabrizi, L., Mohamadi, S. & Motasharezade, B. (2016) The Effect of Arbuscular Mycorrhizal Fungi on Growth and Yield of Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) Under Lead and Cadmium Stress. *Journal of Environmental Sciences*, 13(2), 37-48. <https://doi.org/>
- Tavakoli Hasanaklo, H., Abadi, A., Tavakoli Hasanaklo, N., & Permon, Gh. (2015). Reducing of cadmium stress effects on black seed (*Nigella sativa*) by glycinebetaine pretreatment of seeds. *Plant Process and Function*, 4(11), 99-112. <https://doi.org/20.1001.1.23222727.1394.4.11.4.2>
- Vijayaragavan, M., Prabhakar, C., Sureshkumar, J., Natarajan, A., Vijayarengan, P., & Sharavanan, S. (2011). Toxic effect of cadmium on seed germination, growth and biochemical contents of cowpea (*Vigna unguiculata* L.) plants. *International Multidisciplinary Research Journal*, 1(5).
- Wang, Y., Qian, J., Zhang, C., & Zhang, Z. (2024). Effects of Cadmium Stress on Seed Germination and Physiology and Biochemistry during Early Seedling Growth of Masson Pine (*Pinus massoniana* Lamb.). *Forest Science*, 70(3), 242-249. <https://doi.org/10.1093/forsci/fxae010>
- White, P. J., & Brown, P. (2010). Plant nutrition for sustainable development and global health. *Annals of Botany*, 105(7), 1073-1080. <https://doi.org/10.1093/aob/mcq085>
- Jia, X., Rajib, M. R., & Yin, H. (2020). Recognition pattern, functional mechanism and application of chitin and chitosan oligosaccharides in sustainable agriculture. *Current Pharmaceutical Design*, 26(29), 3508-3521. <https://doi.org/10.2174/1381612826666200617165915>
- Zhang, F., Zhang, H., Wang, G., Xu, L., & Shen, Z. (2009). Cadmium-induced accumulation of hydrogen peroxide in the leaf apoplast of Phaseolus aureus and Vicia sativa and the roles of different antioxidant enzymes. *Journal of Hazardous Materials*, 168(1), 76-84. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.02.002>
- Zhou, Y. G., Yang, Y. D., Qi, Y. G., Zhang, Z. M., Wang, X. J., & Hu, X. J. (2002). Effects of chitosan on some physiological activity in germinating seed of peanut. *Journal of Peanut Science*, 31(1), 22-25.
- Ziaee, T., Moharreri, N., & Hosseinzadeh, H. (2012). Review of pharmacological and toxicological effects of *Nigella sativa* and its active constituents. *Journal of Plant*, 2, 16-42. <https://doi.org/10.5555/20123341055>