University of Birjand

Environmental Stresses in Crop Sciences

Journal homepage:
https://escs.birjand.ac.ir

https://doi.org/10.22077/escs.2026.10570.2426

Original article

Effects of melatonin seed pretreatment on germination, growth, biochemical indices, and secondary metabolites of marigold (*Calendula officinalis* L.) seedlings under cadmium stress

Behrouz Esmailpour[1*]. Fatemeh Mahmoudi[2], Zahra Mahdavi[3], Parisa Sheikhzadeh Mossadegh[4]

1. *Professor, Department of Horticultural Sciences, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Mohaghegh, Ardabil, Iran*
2. *Ph.D., Seed Science and Technology, Department of Plant Production and Genetics, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran*
3. *Department of Horticultural Sciences, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran*
4. *Associate Professor, Department of Plant Production and Genetics, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran*

Received 25 November 2025; Revised 31 December 2025; Accepted 3 January 2026

Extended abstract

Introduction

Marigold, scientifically known as *Calendula officinalis*, is an important medicinal and ornamental plant of the Asteraceae family. Marigold is known for its diverse medicinal properties, including antioxidant, anti-inflammatory, antibacterial, antifungal, and antiviral activities. Research has shown that this plant contains chemical compounds such as α-cadinol, linoleic acid, and salicylic acid. Heavy metal stress is a major abiotic stress and has attracted considerable attention over the past 30 years. A heavy metal is an element characterized by high density that can exert toxic effects even at low concentrations. Among the identified elements, 53 have been classified as heavy metals. Chromium (Cr), lead (Pb), cadmium (Cd), silver (Ag), cobalt (Co), platinum (Pt), arsenic (As), and nickel (Ni) are among the elements that can adversely affect plant physiological processes.

Materials and methods

To investigate the effects of melatonin on the germination, growth, biochemical indices, and some secondary metabolites of seedlings under cadmium stress, a factorial experiment was conducted using a completely randomized design with three replications at the University of Mohaghegh Ardabili. The experiment involved melatonin pretreatment of seeds, followed by the application of cadmium stress during germination in a germinator. To measure the biochemical characteristics of seedlings, samples were randomly collected from 10-day-old normal seedlings and stored at −80 °C until biochemical and enzymatic analyses were performed. Statistical analyses were performed using SAS software, version 9.4. The normality of the data distribution was evaluated using the Kolmogorov–Smirnov test. Means were compared using Duncan's multiple range test at the 5% significance level. Graphs were generated using Microsoft Excel software.

Results and discussion

The results showed that cadmium stress significantly reduced the germination percentage, germination rate and seedling growth. Pretreatment of seeds with 150 µM melatonin improved germination and seedling growth, significantly enhanced the activities of antioxidant enzymes (catalase, peroxidase, and

* Corresponding author: Behrouz Esmailpour; E-Mail: behsmaiel@yahoo.com

© 2027, The Author(s). Published by University of Birjand. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0).

polyphenol oxidase), and increased the contents of phenolic and flavonoid compounds. Melatonin pretreatment reduced the adverse effects of cadmium stress by enhancing the antioxidant system and increasing secondary metabolite content, thereby improving the physiological performance of marigold seedlings. Under cadmium stress at a concentration of 300 mg L^{-1}, the highest germination rate (34.38%) and germination percentage (12.71%) were observed following pretreatment with 150 µM melatonin. The highest seedling dry weight was recorded following pretreatment with 150 µM melatonin, which was significantly higher than that in the other treatments. Conversely, the lowest seedling dry weight was recorded in the control treatment exposed to 300 mg L^{-1} cadmium, which was 91.5% lower than that recorded in seedlings pretreated with 150 µM melatonin. Cadmium stress increased peroxidase activity, with the greatest increase observed at a cadmium concentration of 300 mg L^{-1}, where peroxidase activity was 84.2% higher than in the control treatment. Furthermore, melatonin pretreatment enhanced polyphenol oxidase activity. The highest polyphenol oxidase activity was recorded in seedlings pretreated with 150 µM melatonin and subsequently exposed to 300 mg L^{-1} cadmium stress. This value was significantly higher than the values recorded in the other treatments, representing a 31.70% increase compared with the control. Melatonin pretreatment increased proline content, with the 150 µM treatment resulting in a 64.21% increase.

Conclusion

Seed pretreatment with melatonin, particularly at a concentration of 150 µM, had the most favorable effects on seed germination, seedling growth, and seedling antioxidant enzyme activity under cadmium stress. This study suggests that melatonin could serve as an effective, low-cost, and environmentally friendly biological strategy for enhancing the tolerance of marigold to cadmium stress. Given the positive effects of melatonin on seed and seedling performance, its application is recommended in sustainable agriculture programs, particularly in areas contaminated with cadmium.

Keywords: Antioxidant enzymes, Malondialdehyde, Seed pretreatment

نسخه پیش از انتشار

تنش‌های محیطی در علوم زراعی
Environmental Stresses in Crop Sciences

https://doi.org/10.22077/escs.2026.10570.2426

مقاله پژوهشی

تأثیر پیش‌تیمار بذر با ملاتونین بر جوانه‌زنی، رشد، شاخص‌های بیوشیمیایی و متابولیت‌های ثانویه گیاهچه‌های گل همیشه بهار (*Calendula officinalis* L.) تحت تنش کادمیوم

بهروز اسماعیل‌پور[1*]، فاطمه محمودی[2]، زهرا مهدوی[3]، پریسا شیخ‌زاده مصدق[4]

۱. استاد، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل
۲. دکتری علوم و تکنولوژی بذر، گروه تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل
۳. گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل
۴. دانشیار، گروه تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل

مشخصات مقاله

واژه‌های کلیدی:
آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان
پیش‌تیمار بذر
مالون دی آلدهید

تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۰۹/۰۴
تاریخ بازنگری: ۱۴۰۴/۱۰/۱۳
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۱۰/۱۳

چکیده

این پژوهش با هدف بررسی تأثیر پیش‌تیمار بذر با ملاتونین بر جوانه‌زنی، رشد، شاخص‌های بیوشیمیایی و برخی متابولیت‌های ثانویه گیاهچه‌ی همیشه‌بهار (*Calendula officinalis* L.) تحت تنش کادمیوم، به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی در سه تکرار در دانشگاه محقق اردبیلی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، در آزمایشگاه علوم و تکنولوژی بذر در اسفند سال ۱۴۰۳ انجام شد. این آزمایش به‌صورت پیش‌تیمار ملاتونین روی بذر و سپس اعمال تنش کادمیوم در طول دوره جوانه‌زنی در ژرمیناتور بود. نتایج نشان داد تنش کادمیوم موجب کاهش درصد و سرعت جوانه‌زنی، رشد گیاهچه و فعالیت آنتی‌اکسیدانی به‌صورت معنی‌دار شد. پیش‌تیمار بذر با ملاتونین در غلظت ۱۵۰ میکرومولار، موجب بهبود جوانه‌زنی و رشد گیاهچه، افزایش معنی‌دار فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی (کاتالاز، پراکسیداز و پلی‌فنل اکسیداز) و افزایش محتوای ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی گردید. پیش‌تیمار بذر با ملاتونین توانست با تقویت سیستم آنتی‌اکسیدانی و افزایش ترکیبات متابولیت‌های ثانویه، اثرات منفی تنش کادمیوم را کاهش داده و موجب بهبود عملکرد فیزیولوژیک گیاهچه‌های همیشه‌بهار شد. در شرایط تنش ۳۰۰ میلی‌گرم در لیتر کادمیوم بیشترین سرعت (۳۴/۳۸ درصد) و درصد جوانه‌زنی (۱۲/۷۱ درصد) در تیمار ۱۵۰ میکرومولار ملاتونین مشاهده شد؛ بنابراین، استفاده از ملاتونین می‌تواند راهکاری مؤثر برای افزایش تحمل گیاهان دارویی به تنش فلزات سنگین باشد. در مجموع، پیش‌تیمار بذر با ۱۵۰ میکرومولار ملاتونین، در سطوح مختلف تنش کادمیوم از راه افزایش توان بذر و گیاهچه و افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی بیشترین اثر مثبت را بر جوانه‌زنی و رشد گیاهچه‌های همیشه‌بهار داشت.

مقدمه

همیشه‌بهار با نام علمی *Calendula officinalis* L. از جمله گیاهان دارویی و زینتی مهم خانواده کاسنی (Asteraceae) است (Sohrabi et al., 2024; Olennikov et al., 2022). گل همیشه‌بهار به دلیل غنی‌بودن از ترکیبات زیست‌فعال متنوع، از جمله آنتی‌اکسیدان‌ها، عوامل ضدالتهابی، ضدباکتریایی، ضدقارچی و ضدویروسی، در مطالعات دارویی و پژوهش‌های علمی به‌خوبی موردتوجه قرار گرفته است (Karimi et al., 2024). گلبرگ‌ها و گرده‌ها حاوی استرهای تری‌ترپنوئید و همچنین کاروتنوئیدهای فلاوگزانتین و آئوروگزانتین (آنتی‌اکسیدان‌ها و منبع رنگ زرد-نارنجی) هستند (Savic Gajic et al., 2022). مرحله جوانه‌زنی و رشد گیاهچه یکی از مهم‌ترین و تعیین‌کننده‌ترین مراحل رشدی گیاه بوده که بر میزان تولید محصول اثر می‌گذارد، اما این مراحل به‌شدت تحت‌تأثیر تنش‌های محیطی قرار می‌گیرد، ازاین‌رو به‌عنوان یک معیار مناسب برای تعیین میزان تحمل گیاهان به تنش پیشنهاد شده است.

* نگارنده پاسخگو: بهروز اسماعیل‌پور. پست الکترونیک: behsmaiel@yahoo.com

تنش فلزات سنگین یکی از بحرانی‌ترین عوامل غیرزیستی است که در ۳۰ سال گذشته توجه زیادی را به خود جلب کرده است (De Caroli et al., 2020). باتوجه‌به پیشرفت‌های بخش کشاورزی و صنعتی، توجه جدی به مسائل مربوط به سمیت کادمیوم در چند دهه گذشته معطوف شده است (Jawad Hassan et al., 2020). کاهش شاخص‌های جوانه‌زنی بذر و رشدی گیاهچه‌ها در گاوزبان (*Borago officinalis* L.) (Mahmoudi et al., 2019;)، سورگوم (*Sorghum bicolor*) (Sheikhzadeh et al., 2021)، رازیانه (*Foeniculum vulgare*) (Jawad Hassan et al., 2020)، نخود (*Cicer arietinum*) (Zhao et al., 2021) و کینوا (*Chenopodium quinoa* willd.) (Singhal et al., 2022) در اثر تنش کادمیوم گزارش شده است. ازآنجایی‌که تنش کادمیوم، موجب کاهش جوانه‌زنی و شاخص‌های رشدی گیاهچه‌ها مانند طول ریشه‌چه و ساقه‌چه می‌شود، بنابراین به‌کاربردن روش‌هایی که بتواند موجب کاهش تأثیر منفی تنش فلزهای سنگین از جمله کادمیوم شده، اهمیت بسیاری دارد.

ملاتونین به علت اندازه کوچک و طبیعت دوگانه آب‌دوستی-چربی‌دوستی به‌آسانی از غشا عبور می‌کند و وارد سلول می‌شود (Beiranvand et al., 2024). ملاتونین (N-acetyl-5-methoxytryptamine) یک ایندول آمین مشتق شده از تریپتوفان است که برای اولین‌بار در سال ۱۹۵۸ در غده صنوبری گاو شناسایی شد (Zhang et al., 2017; Hoque et al., 2021). محتوای ملاتونین در گیاهان بسیار متغیر است و از پیکوگرام تا میکروگرم در هر گرم ماده گیاهی مورد تجزیه‌وتحلیل متغیر است. فیتوملاتونین (ملاتونین گیاهی) در طیف گسترده‌ای از گیاهان، از خوراکی گرفته تا انواع وحشی و در تمام بافت‌ها و اندام‌ها مانند دانه‌ها، ساقه‌ها، برگ‌ها، ریشه‌ها، گل‌ها و میوه‌ها شناسایی شده است (Zhang et al., 2020; Wu et al., 2021). باتوجه‌به تنوع عملکردهای ملاتونین، در گیاهان در فرایندهای مختلفی مانند جوانه‌زنی، ریشه‌زایی، رشد، کارایی فتوسنتز، پارتنوکارپی، میوه‌دهی، رسیدن و پیری و چه در اعمال یا عوامل مرتبط مانند هدایت روزنه‌ای، CO_2 بین‌سلولی، فعالیت روبیسکو، کارایی فتوسیستم و غیره، فیتوملاتونین به‌عنوان یک تنظیم‌کننده اصلی در گیاهان پیشنهاد شده است (Ren et al., 2019)، این نام‌گذاری همچنین به دلیل توصیف گسترده ملاتونین به‌عنوان تنظیم‌کننده بیان ژن و ارتباط آن با سایر فیتوهورمون‌ها مانند اکسین، سیتوکینین‌ها، جیبرلین‌ها، اسید آبسیزیک، اسید جاسمونیک، اسید سالیسیلیک و اتیلن است (Ma et al., 2018). محتوای ملاتونین می‌تواند به‌صورت بیرونی توسط عوامل تنش‌زای زیستی و غیرزیستی از طریق چندین پیام‌رسان ثانویه مانند گونه‌های فعال اکسیژن ROS و نیتروژن RNS، سیگنال‌های انتقال‌دهنده گاز (اکسید نیتریک و سولفید هیدروژن) و تداخل با سایر هورمون‌های گیاهی تنظیم شود (Campos et al., 2019). پرایمینگ بذر با ملاتونین همچنین جوانه‌زنی بذرهای ذرت مومی را تحت تنش سرما بهبود بخشیده و آنها را از اکسیداسیون محافظت می‌کند (Nawaz et al., 2021). پرایمینگ بذر می‌تواند سرعت جوانه‌زنی را در شرایط تنش در مقایسه با بذرهای پرایم نشده بهبود بخشد، زیرا به یک جوانه‌زنی سریع و یکنواخت دست می‌یابد که منجر به استقرار موفقیت‌آمیز گیاه می‌شود. افزایش فعالیت جوانه‌زنی در اثر پیش‌تیمار با ملاتونین در مطالعات اولیه روی کلم قرمز و خیار نشان داده شده است (Wang et al., 2019). پیش‌تیمار با ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار ملاتونین، محتوای هورمون‌های گیاهی درون‌زا و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی را تغییر داد تا مقاومت به خشکی در گیاهچه‌های سویا را بهبود بخشد (Gu et al., 2017).

اسپری‌کردن ۱۰۰ میکرومولار ملاتونین، فعالیت آنزیم آنتی‌اکسیدانی گیاهچه‌های برنج را افزایش داد تا اثرات تنش سرب را کاهش دهد (Zhang et al., 2020). ملاتونین برون‌زا با جلوگیری از تولید بیش از حد ROS و بهبود هموستاز Na^+/K^+، تحمل به شوری برنج را بهبود بخشید (Miri et al., 2023). ملاتونین خارجی می‌تواند برای پیش‌تیمار بذر خیار برای کاهش آسیب اکسیداتیو ناشی از تنش شوری، افزایش بیان ژن آنتی‌اکسیدان‌ها و کاهش بازدارندگی نمک بر جوانه‌زنی بذر استفاده شود (Lv et al., 2019). جوانه‌زنی بذر پنبه را می‌توان با افزایش سرعت جوانه‌زنی، افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، کاهش تجمع مالون‌دی‌آلدئید (MDA) و تنظیم هورمون‌ها افزایش داد. ملاتونین به طور مؤثر طول ریشه‌های بذری و رشد برنج تک‌لپه را پس از جوانه‌زنی تنظیم می‌کند (Bao et al., 2021).

آلودگی فلزات سنگین به‌ویژه کادمیوم یکی از مهم‌ترین عوامل محدودکننده جوانه‌زنی و رشد گیاهان دارویی است که

نسخه پیش از انتشار

با ایجاد تنش اکسیداتیو، به کاهش فعالیت آنتی‌اکسیدانی و تخریب سلولی منجر می‌شود. در سال‌های اخیر، ملاتونین به‌عنوان یک تنظیم‌کننده طبیعی رشد و آنتی‌اکسیدان مؤثر، در کاهش اثرات تنش‌های محیطی شناخته شده است، اما اطلاعات درباره‌ی نقش آن در بهبود تحمل گیاه دارویی گل همیشه‌بهار (*Calendula officinalis* L.) در برابر کادمیوم بسیار محدود است.

ازاین‌رو، این پژوهش با هدف بررسی اثر پیش‌تیمار بذر با ملاتونین بر شاخص‌های جوانه‌زنی، رشد، فعالیت آنتی‌اکسیدانی و متابولیت‌های ثانویه گیاهچه‌ی همیشه‌بهار تحت تنش کادمیوم انجام شد.

مواد و روش‌ها

به‌منظور بررسی تأثیر ملاتونین بر جوانه‌زنی، رشد، شاخص‌های بیوشیمیایی و برخی متابولیت‌های ثانویه گیاهچه همیشه‌بهار تحت تنش کادمیوم، آزمایشی به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح پایه‌ی کاملاً تصادفی در سه تکرار در دانشگاه محقق اردبیلی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، به‌صورت مشترک بین گروه مهندسی علوم باغبانی و گروه تولید و ژنتیک گیاهی در آزمایشگاه علوم و تکنولوژی بذر در اسفند سال ۱۴۰۳ اجرا گردید. تیمارها شامل تنش کادمیوم در سه سطح (صفر (عدم اعمال کادمیوم، شاهد)، ۱۰۰ و ۳۰۰ میلی‌گرم در لیتر)، غلظت‌های ملاتونین در چهار سطح (شاهد، ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میکرومولار) بودند.

کادمیوم کلراید ($CdCl_2\frac{1}{2}H_2O$) (شرکت سازنده مرک آلمان) و ملاتونین (شرکت سازنده BioBasic-MB0605) برای اعمال تیمارها تهیه شدند. بذر همیشه‌بهار مورداستفاده در این پژوهش از شرکت پاکان بذر اصفهان تهیه شد.

قبل از اعمال تیمارها، بذرها با هیپوکلرید سدیم دو درصد به مدت یک دقیقه ضدعفونی و سپس با آب مقطر شست‌وشو داده شدند. برای اعمال پیش‌تیمار بذر با ملاتونین، بعد از تهیه محلول‌ها با غلظت ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میکرومولار، بذور ضدعفونی شده به مدت ۱۲ ساعت در غلظت‌های تعیین شده در ارلن‌های ۱۰۰ میلی‌لیتری قرار داده شدند. سپس در انکوباتوری با دمای ۲۰ درجه سلسیوس به مدت ۱۲ ساعت نگهداری شدند. پس از اتمام مدت‌زمان، بذور تا رسیدن به رطوبت اولیه در محیط آزمایشگاه خشکانده شدند (Sheikhzadeh et al., 2021). به‌منظور انجام آزمون جوانه‌زنی، ۲۵ عدد بذر همیشه‌بهار به طور تصادفی و در ۳ تکرار به روش «روی کاغذ» (Top of paper) در داخل پتری‌دیش‌های نه سانتیمتری پلاستیکی قرار داده شدند و بر اساس تیمارهای موردنظر، ۳ میلی‌لیتر محلول کادمیوم در غلظت‌های ۱۰۰ و ۳۰۰ میلی‌گرم در لیتر به پتری دیش‌ها اضافه شدند (برای تیمار شاهد از آب مقطر استفاده شد). نمونه‌ها سپس به ژرمیناتور مدل GROUC. GC.400 (IRAN) در دمای ۲۰ ± ۲ درجه سلسیوس و رطوبت نسبی حدود ۷۰ تا ۸۰ درصد، در شرایط نور انتقال‌داده‌شده و به مدت ۱۰ روز در این شرایط قرار گرفتند. تعداد بذور جوانه‌زده هر ۱۲ ساعت شمارش و یادداشت شدند. ظهور ریشه‌چه به‌اندازه‌ی ۲ میلی‌متر معیاری برای جوانه‌زنی بذرها در نظر گرفته شد (ISTA, 2017). پس از اتمام ۱۰ روز مدت جوانه‌زنی، تعداد جوانه‌های نرمال شمارش و درصد جوانه‌زنی (Ellis and Roberts, 1981) و سرعت جوانه‌زنی (Rajpar et al., 2006) تعیین شد. همچنین طول گیاهچه با استفاده از خط‌کش مدرج و وزن خشک گیاهچه با استفاده از ترازو (مدل GF-300) اندازه‌گیری شد.

برای بررسی صفات بیوشیمیایی، نمونه‌های تصادفی از گیاهچه‌های نرمال ۱۰ روزه انتخاب و تا زمان آزمایش در فریزر با دمای ۸۰− درجه سانتیگراد نگهداری شدند. عصاره آنزیمی مطابق روش چاتنگ و کوآ (Chang and Koa, 1988) تهیه شد: ۰/۸ گرم از بافت تازه هر نمونه آسیاب و با ۶ میلی‌لیتر بافر استخراج (Tris-HCl ۰/۵ مولار، pH=7، $MgCl_2$ (منیزیم کلرید) سه میلی‌مولار؛ EDTA یک میلی‌مولار) مخلوط شد. نمونه‌ها به مدت ۲۰ دقیقه در سانتریفیوژ با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه و دمای ۴ درجه سانتیگراد سانتریفیوژ شده و عصاره حاصل جهت تعیین فعالیت آنزیمی در فریزر با دمای منفی ۷۰ درجه سانتیگراد نگهداری گردید.

فعالیت آنزیم کاتالاز با استفاده از روش ابی (Aebi, 1984) و دستگاه اسپکتروفتومتر مدل UV 2100 ساخت امریکا اندازه‌گیری شد. محلول بلانک حاوی مخلوط واکنش بدون عصاره گیاهی بود. فعالیت آنزیم کاتالاز با استفاده از رابطه (۱) محاسبه شد.

$$Unit/ml\ enzyme\ extract = \frac{(\Delta A240nm)(3)(df)}{(40)\ (0.05)} \qquad [1]$$

در این رابطه ΔA۲۴۰ عدد قرائت شده توسط اسپکتروفتومتر در طول‌موج ۲۴۰ نانومتر، ۳ حجم محلول مورد سنجش بر حسب میلی‌لیتر، df ضریب رقت، ۰/۰۵ حجم عصاره آنزیمی

نسخه پیش از انتشار

بر حسب میلی‌لیتر، ۴۰ ضریب خاموشی پراکسید هیدروژن عدد به‌دست‌آمده بیان‌کننده فعالیت آنزیم کاتالاز بر حسب هر واحد از آنزیم است.

فعالیت آنزیم پراکسیداز بر اساس روش ماهلی (Maehly,1955) تشکیل تتراگایاکول از گایاکول در حضور پراکسید هیدروژن تعیین شد. مخلوط واکنش شامل ۳ میلی‌لیتر بافر پتاسیم فسفات ۵۰ میلی‌مولار (pH=7)، ۵۰ میکرولیتر گایاکول ۲۰ میلی‌مولار، ۵۰ میکرولیتر پراکسید هیدروژن ۱۵ میلی‌مولار و ۵۰ میکرولیتر عصاره سلولی بود. پس از افزودن عصاره، کاهش جذب در طول‌موج ۴۷۰ نانومتر به مدت یک دقیقه با اسپکتروفتومتر مدل UV 2100 ساخت آمریکا اندازه‌گیری شد. فعالیت آنزیم با استفاده از ضریب خاموشی (ε=26.6 $mM^{-1}cm^{-1}$) برای تتراگایاکول برحسب واحد در میلی‌لیتر عصاره آنزیمی، همان‌طور که در رابطه (۲) ارائه شده است، محاسبه گردید.

$$Unit/\ ml\ enzyme = \frac{(\Delta A470nm)(3)(df)}{(26.6)(0.05)} \qquad [۲]$$

در این رابطه $\Delta A470$ میزان جذب قرائت شده از هر نمونه توسط اسپکتروفتومتر، عدد سه مقدار حجم واکنش، df ضریب رقت، ۲۶/۶ ضریب خاموشی تتراگایاکول، عدد ۰/۰۵ حجم عصاره آنزیمی مورداستفاده برحسب میلی‌لیتر.

غلظت پرولین با استفاده از روش بیتس و همکاران (Bates et al., 1973) اندازه‌گیری شد. به‌منظور اندازه‌گیری محتوای پرولین، ۰/۰۱ گرم از بافت تازه گیاهچه همیشه‌بهار در ۱۰ میلی‌لیتر اسید سولفوسالسیلیک ۳ درصد آسیاب شد و به مدت ۱۰ دقیقه در سانتریفیوژ با سرعت ۴۰۰۰ دور در دقیقه و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ گردید. سپس ۲ میلی‌لیتر از عصاره حاصل با ۲ میلی‌لیتر معرف نین هیدرین مخلوط شد؛ معرف نین هیدرین شامل ۱/۲۵ گرم پودر نین هیدرین حل شده در ۳۰ میلی‌لیتر اسید استیک گلاسیال به همراه ۲ میلی‌لیتر اسید فسفریک ۶ مولار و ۲ میلی‌لیتر اسید استیک گلاسیال خالص است. لوله‌ها به مدت یک ساعت در حمام آب گرم قرار داده شدند، سپس ۴ میلی‌لیتر تولوئن به هر لوله افزوده و به مدت ۱۵ تا ۲۰ ثانیه با ورتکس مخلوط گردید. فاز رنگی بالایی بادقت جدا شد و تغییرات جذب آن در طول‌موج ۵۲۰ نانومتر با استفاده از اسپکتروفتومتر BIORAD مدل Smartspec™ plus ساخت آمریکا قرائت شد. محتوی پرولین بر اساس میلی‌گرم بر گرم وزن تازه گیاهی با استفاده از منحنی استاندار تهیه شده با پرولین، تعیین شد.

ترکیبات فنل با استفاده از معرف فولین سیوکالتئو در طول‌موج ۷۶۵ نانومتر اندازه‌گیری شد (Wojdylo et al., 2007). در هر مرحله، ۲۰ میکرولیتر از عصاره با ۱/۵۸ میلی‌لیتر آب مقطر و ۱۰۰ میکرولیتر معرف فولین-سیوکالتیو مخلوط گردید. پس از یک دقیقه، ۱/۵ میلی‌لیتر محلول سدیم کربنات ۲۰ درصد به آن افزوده شد و مخلوط توسط ورتکس هم زده شد. سپس نمونه‌ها در دمای اتاق و در تاریکی به مدت دو ساعت نگهداری شده و جذب آن‌ها در طول‌موج ۷۶۵ نانومتر با استفاده از اسپکتروفتومتر BIORAD مدل Smartspec™ plus قرائت شد. از اسید گالیک به‌عنوان استاندارد در بازه ۵۰ تا ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر استفاده شد. میزان فلاونوئید با استفاده از معرف کلرید آلومینیوم انجام شد (Menichini et al., 2008). مقدار ۷۵ میکرولیتر از هر نمونه به‌صورت متوالی با ۵۰۰ میکرولیتر عصاره متانول، ۱۰۰ میکرولیتر آمونیوم کلرید (۱۰درصد) و ۱۰۰ میکرولیتر استات پتاسیم (۱ مولار) و ۲۸۰۰ میکرولیتر آب مقطر مخلوط شد. مخلوط به مدت ۳۰ دقیقه در اتاق تاریک قرار داده شد و جذب نمونه‌ها در طول‌موج ۵۱۰ نانومتر قرائت شد (مدل BIORAD, SmartspecTM plus). برای اندازه‌گیری میزان مالون‌دی‌آلدهید از روش هس و پاکر (Heath and Packer, 1968) استفاده شد. طبق این روش، ۰/۲ گرم از بافت تازه برگ توزین شده و در هاون چینی با ۵ میلی‌لیتر اسید تری‌کلرواستیک (TCA) ۰/۱ درصد آسیاب شد. عصاره حاصل به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ گردید. سپس به ۱ میلی‌لیتر از محلول رویی، ۴/۵ میلی‌لیتر محلول ۲۰ درصد TCAحاوی ۵ گرم اسید تیوباربیتوریک (TCA)، در ۱۰۰ گرم اضافه شد. مخلوط حاصل به مدت ۱۰ دقیقه در سانتریفیوژ با سرعت ۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ گردید و سپس در طول‌موج ۵۳۲ در دستگاه اسپکتروفتومتر (BIORAD, SmartspecTM plus) خوانده شد. مقدار پراکسید هیدروژن بر اساس واکنش پراکسید هیدروژن با یدید پتاسیم (KI) تعیین شد (Alexieva et al., 2001). در این روش، ۵۰۰ میلی‌گرم از بافت گیاهچه‌های همیشه‌بهار در ۰/۱ درصد TCA و در حمام آب یخ آسیاب شد. عصاره حاصل به مدت ۱۵ دقیقه در سانتریفیوژ با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ گردید. سپس به ۰/۵ میلی‌لیتر از محلول رویی، بافر فسفات پتاسیم ۱۰ میلی‌مولار با pH ۷/۵ و ۱

نسخه پیش از انتشار

میلی‌لیتر یدید پتاسیم ۱ مولار افزوده شد. محلول واکنش به مدت یک ساعت در تاریکی در دمای اتاق نگهداری شد و جذب نمونه‌ها در طول‌موج ۳۹۰ نانومتر با استفاده از اسپکتروفتومتر (مدل UV-2100) ساخت آمریکا اندازه‌گیری شد.

تجزیه‌وتحلیل آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS نسخه ۹/۴ انجام شد. نرمال بودن توزیع داده‌ها با آزمون کولموگروف-اسمیرنوف بررسی گردید و مقایسه میانگین‌ها با آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح اطمینان ۵ درصد صورت گرفت. نمودارها با بهره‌گیری از نرم‌افزار Excel رسم شدند.

نتایج و بحث

درصد جوانه‌زنی

نتایج حاصل از جدول تجزیه واریانس داده‌ها (جدول ۱) نشان داد که درصد جوانه‌زنی تحت‌تأثیر تنش کادمیوم، ملاتونین و اثر متقابل کادمیوم × ملاتونین در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود.

تنش کادمیوم باعث کاهش معنی‌دار و پیش‌تیمار بذر با ملاتونین موجب افزایش درصد جوانه‌زنی بذور همیشه‌بهار شد. در بین تیمارهای موردمطالعه باتوجه‌به نتایج (شکل ۱) مشاهده گردید که تیمار ۱۵۰ میکرومولار ملاتونین در شرایط تنش ۳۰۰ میلی‌گرم در لیتر کادمیوم، بالاترین درصد جوانه-زنی را به نام خود ثبت کرد و موجب افزایش ۱۲/۷۱ درصدی در میزان درصد جوانه‌زنی نسبت به تیمار شاهد شد (شکل ۱). بیشترین درصد جوانه‌زنی در شرایط بدون تنش کادمیوم در تیمار ۱۵۰ میکرومولار ملاتونین به دست آمد که اختلاف معنی‌داری با تیمار ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار ملاتونین نداشت. در شرایط وجود تنش کادمیوم نیز کاربرد غلظت‌های ۵۰ تا ۱۵۰ میکرومولار ملاتونین موجب افزایش معنی‌دار درصد جوانه‌زنی بذرهای همیشه‌بهار گردید. در این شرایط در بین غلظت‌های مختلف ملاتونین بیشترین درصد جوانه‌زنی با کاربرد غلظت ۱۵۰ میکرومولار ملاتونین حاصل شد (شکل ۱).

سرعت جوانه‌زنی

سرعت جوانه‌زنی تحت‌تأثیر تنش کادمیوم، ملاتونین و اثر متقابل کادمیوم × ملاتونین در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار شد (جدول ۱). با افزایش تنش کادمیوم سرعت جوانه‌زنی در کلیه سطوح ملاتونین در مقایسه با شاهد افزایش داشت، به‌طوری‌که در بین تیمارهای موردمطالعه کمترین سرعت جوانه‌زنی با کاربرد غلظت ۳۰۰ میلی‌گرم در لیتر کادمیوم در تیمار شاهد ملاتونین مشاهده شد که به طور معنی‌داری کمتر از سایر سطوح تنش کادمیوم (غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر) بود. در شرایط تنش ۳۰۰ میلی‌گرم در لیتر کادمیوم بیشترین سرعت جوانه‌زنی (۶۹/۳۷ ساعت) در تیمار ۱۵۰ میکرومولار ملاتونین مشاهده شد که موجب افزایش ۳۴/۳۸ درصدی سرعت جوانه‌زنی نسبت به تیمار شاهد شد (شکل ۲).

طول گیاهچه

بر اساس نتایج حاصل از جدول تجزیه واریانس داده‌ها طول گیاهچه تحت‌تأثیر تنش کادمیوم، ملاتونین و اثر متقابل کادمیوم × ملاتونین در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار شد (جدول ۱).

تنش کادمیوم باعث کاهش معنی‌دار طول گیاهچه همیشه‌بهار در تیمار شاهد شد (شکل ۳). در بین تیمارهای موردمطالعه کمترین طول گیاهچه با کاربرد غلظت ۳۰۰ میلی‌گرم در لیتر کادمیوم مشاهده شد طوری که کاربرد ۱۵۰ میکرومولار ملاتونین به‌صورت پیش‌تیمار به ترتیب در شرایط بدون تنش کادمیوم و تنش کادمیوم (۳۰۰ میلی‌گرم در لیتر کادمیوم) به ترتیب طول گیاهچه را ۳۲/۱۱ و ۳۸/۲۳ درصد نسبت به تیمار شاهد افزایش داد (شکل ۳). در شرایط بدون تنش کادمیوم، بیشترین طول گیاهچه (۱۱/۰۵ سانتیمتر) در تیمار ۱۵۰ میکرومولار ملاتونین مشاهده شد که اختلاف معنی‌داری با ۱۰۰ و ۵۰ میکرومولار در لیتر ملاتونین نداشت (شکل ۳).

وزن خشک گیاهچه

بر اساس نتایج حاصل از جدول تجزیه واریانس داده‌ها (جدول ۱) وزن خشک گیاهچه تحت‌تأثیر تنش کادمیوم، ملاتونین و اثر متقابل کادمیوم × ملاتونین معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد شد. نتایج نشان داد که وزن خشک گیاهچه در بالاترین سطح کادمیوم (۳۰۰ میلی‌گرم در لیتر) در شرایط پیش‌تیمار ۱۵۰ میکرومولار ملاتونین مشاهده شد. پیش‌تیمار نمودن بذور همیشه‌بهار با ملاتونین موجب شد تا وزن خشک گیاهچه هم در شرایط بدون تنش و هم در شرایط تنش کادمیوم افزایش یابد. به‌طوری‌که در تمام سطوح تنش کادمیوم،

نسخه پیش از انتشار

بیشترین میزان وزن خشک گیاهچه در شرایط پیش‌تیمار ۱۵۰ میکرومولار ملاتونین مشاهده شد که به طور معنی‌داری بیشتر از سایر تیمارها بود همچنین کمترین وزن خشک گیاهچه با کاربرد غلظت ۳۰۰ میلی‌گرم در لیتر کادمیوم در تیمار شاهد مشاهده شد که ۹۱/۵ درصد کمتر از بذور پیش-تیمار شده با ملاتونین ۱۵۰ میکرومولار بود (شکل ۴).

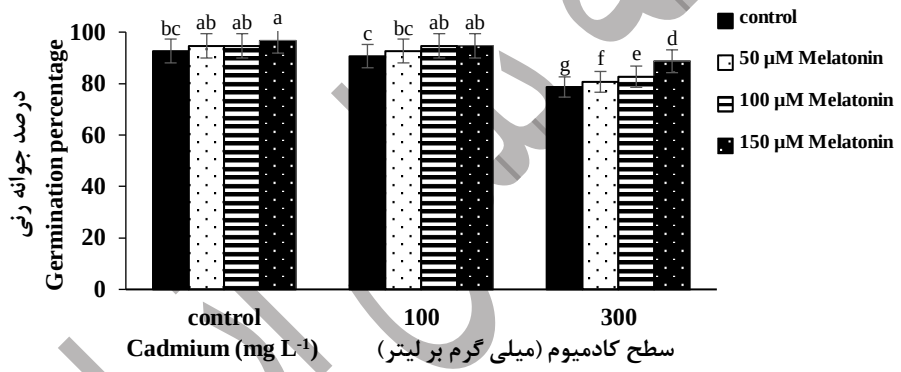
جدول ۱. تجزیه واریانس اثرات تنش کادمیوم و ملاتونین بر جوانه‌زنی بذر و رشد گیاهچه‌های همیشه‌بهار

Table 1. Analysis variance of cadmium stress and Melatonin effects on seed germination and growth of marigold seedlings

S.O.V	منابع تغییر	df	درصد جوانه‌زنی Germination percentage	سرعت جوانه‌زنی Germination rate	طول گیاهچه Seedling length	وزن خشک گیاهچه Seedling dry weight
Cadmium stress (Ca)	تنش کادمیوم	2	513**	118.14*	44.12**	0.80**
Melatonin (M)	ملاتونین	3	57**	440.19**	3.62**	0.085**
M × Ca	ملاتونین× تنش کادمیوم	6	9**	9.82**	0.53**	0.003**
Error	خطا	24	1.33	2	0.055	0.0001
CV %	ضریب تغییرات		*1.28*	*2.51*	*2.62*	*1.73*

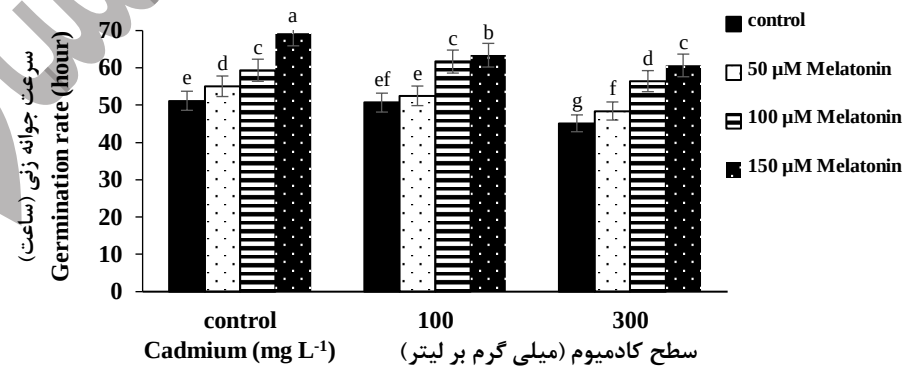
**Significant at the one percent probability level

** معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد



شکل ۱. تأثیر کادمیوم و ملاتونین بر درصد جوانه‌زنی بذور همیشه‌بهار. مقادیر میانگین سه تکرار ± انحراف معیار هستند.

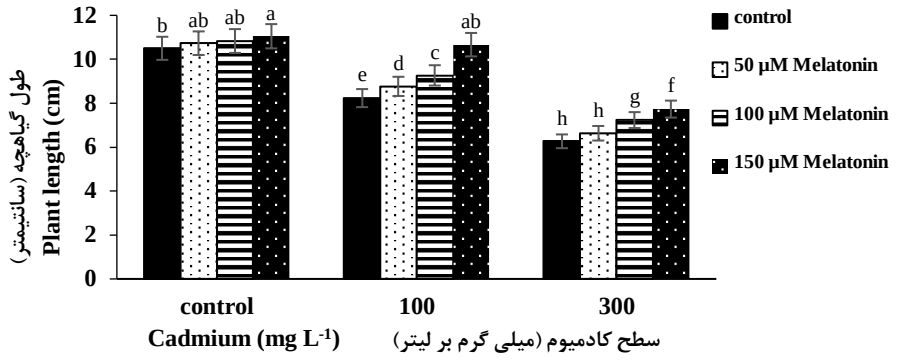
Fig. 1. The Effect of Cadmium and Melatonin on the Germination Percentage of Pot Marigold Seeds. The values are the mean values of Three repetitions ± standard deviation.



شکل ۲. تأثیر تیمار ملاتونین بر سرعت جوانه‌زنی بذور همیشه‌بهار تحت تنش کادمیوم. مقادیر میانگین سه تکرار ± انحراف معیار هستند.

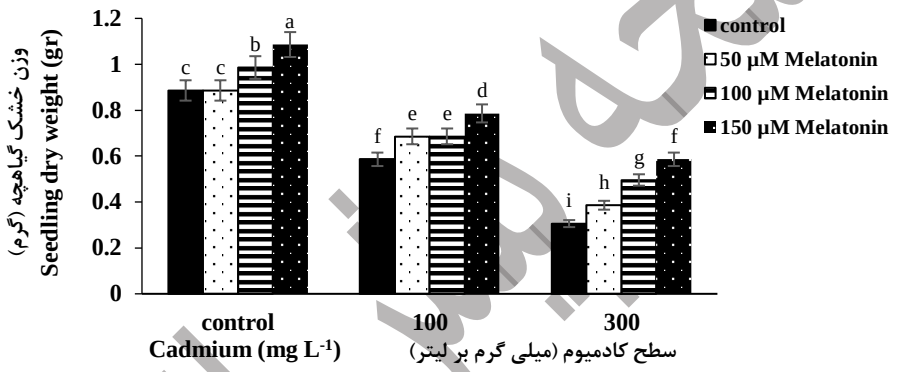
Fig. 2. The effect of melatonin treatment on the Germination rate of marigold seeds under cadmium stress. The values are the mean values of three repetitions ± standard deviation

نسخه پیش از انتشار



شکل ۳. تأثیر تیمار کادمیوم و ملاتونین بر میانگین طول گیاهچه همیشه‌بهار. مقادیر میانگین سه تکرار ± انحراف معیار هستند.

Fig. 3. The Effect of Cadmium and Melatonin on plant length of marigold seedling length. The values are the mean values of three repetitions ± standard deviation



شکل ۴. تأثیر تیمارکادمیوم و ملاتونین بر میانگین وزن خشک گیاهچه‌های همیشه‌بهار. مقادیر میانگین سه تکرار ± انحراف معیار هستند.

Fig. 4. The Effect of Cadmium and Melatonin on the dry weight of marigold seedling lengthunder cadmium stress. The values are the mean values of three repetitions ± standard deviation.

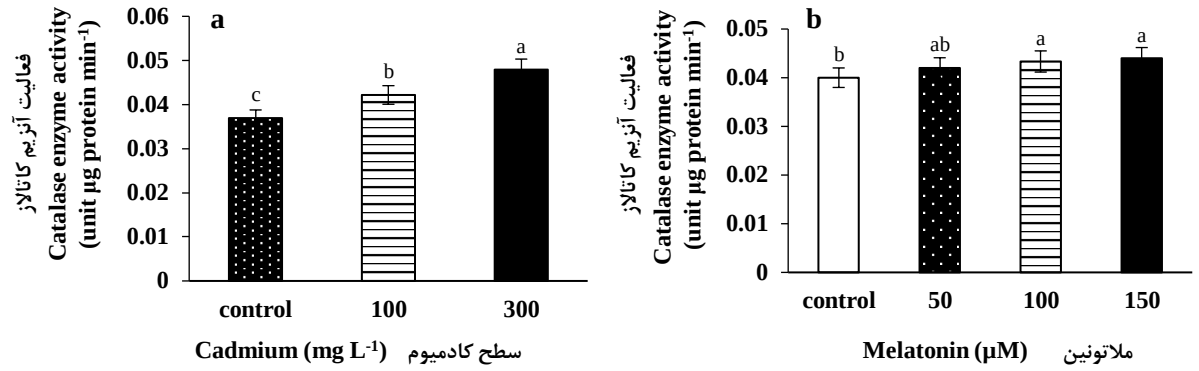
فعالیت آنزیم کاتالاز

بر اساس نتایج حاصل از جدول تجزیه واریانس داده‌ها (جدول ۲) فعالیت آنزیم کاتالاز تحت‌تأثیر تنش کادمیوم و ملاتونین در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار شد؛ اما اثر متقابل کادمیوم × ملاتونین معنی‌دار نشد. تنش کادمیوم فعالیت آنزیم کاتالاز را افزایش داد طوری که ۳۰۰ میلی‌گرم در لیتر تنش کادمیوم فعالیت آنزیم کاتالاز را نسبت به تیمار شاهد به مقدار ۳۰/۵۵ درصد افزایش داد که در مقایسه با سایر تیمارها معنی‌دار بود (شکل ۵ a). پیش‌تیمار نمودن بذور همیشه‌بهار با ملاتونین موجب شد تا فعالیت آنزیم کاتالاز افزایش یابد. به‌طوری‌که بیشترین فعالیت آنزیم کاتالاز در شرایط پیش-تیمار ۱۵۰ میکرومولار ملاتونین مشاهده شد که به طور معنی‌داری بیشتر از سایر تیمارها بود؛ اما اختلاف معنی‌داری با پیش‌تیمار ۱۰۰ و ۵۰ میکرومولار ملاتونین نداشت (شکل ۵ b).

فعالیت آنزیم پراکسیداز

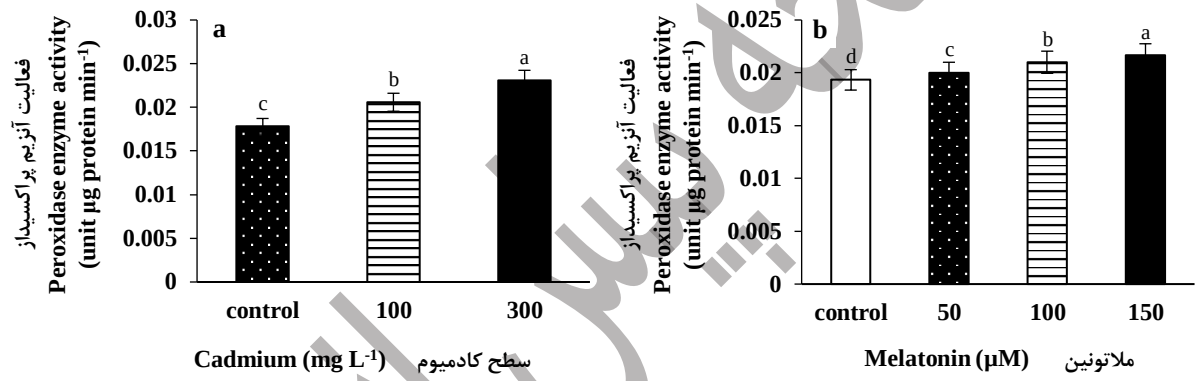
فعالیت آنزیم پراکسیداز تحت‌تأثیر اثر ساده تنش کادمیوم و ملاتونین قرار گرفت؛ اما اثر متقابل کادمیوم × ملاتونین در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار نشد (جدول ۲). تنش کادمیوم فعالیت آنزیم پراکسیداز را افزایش داد به‌طوری‌که بیشترین افزایش فعالیت آنزیم پراکسیداز در تنش کادمیوم ۳۰۰ میلی‌گرم در لیتر مشاهده شد و فعالیت آنزیم پراکسیداز را ۲/۸۴ درصد نسبت به تیمار شاهد افزایش داد (شکل ۶ a). تیمار ملاتونین موجب افزایش فعالیت آنزیم پراکسیداز شد به‌طوری‌که بیشترین افزایش فعالیت آنزیم پراکسیداز در شرایط پیش‌تیمار ۱۵۰ میکرومولار ملاتونین مشاهده شد (شکل ۶ b).

نسخه پیش از انتشار



شکل ۵.تأثیر تیمار تنش کادمیوم (a) و ملاتونین (b) بر فعالیت آنزیم کاتالاز گیاهچه‌های همیشه‌بهار. مقادیر میانگین سه تکرار ± انحراف معیار هستند.

Fig. 5. The effect of cadmium stress treatment (a) and melatonin (b) on catalase enzyme activityof marigold seedlings. The values are the mean values of three repetitions ± standard deviation.



شکل ۶. تأثیر تیمار تنش کادمیوم (a) و ملاتونین (b) بر فعالیت آنزیم پراکسیداز گیاهچه‌های همیشه‌بهار. مقادیر میانگین سه تکرار ± انحراف معیار هستند.

Fig. 6. The effect of cadmium stress treatment (a) and melatonin (b) on Peroxidase enzyme activityof marigold seedlings. The values are the mean values of three repetitions ± standard deviation.

فعالیت آنزیم پلی‌فنل اکسیداز

بر اساس نتایج جدول تجزیه واریانس، فعالیت آنزیم پلی‌فنل اکسیداز تحت‌تأثیر اثر ساده تنش کادمیوم و ملاتونین و اثر متقابل کادمیوم × ملاتونین در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار شد (جدول ۲). تنش کادمیوم موجب افزایش میزان فعالیت آنزیم پلی‌فنل اکسیداز شد همچنین پیش‌تیمار با ملاتونین میزان فعالیت آنزیم پلی‌فنول اکسیداز را افزایش داد طوری که بیشترین میزان فعالیت آنزیم پلی‌فنل اکسیداز در شرایط تنش ۳۰۰ میلی‌گرم در لیتر کادمیوم و پیش‌تیمار ۱۵۰ میکرومولار ملاتونین به دست آمد که به طور معنی‌داری بیشتر از سایر تیمارها بود و باعث افزایش ۳۱/۷۰ درصدی نسبت به تیمار شاهد بود (شکل ۷).

در شرایط بدون تنش کادمیوم، بیشترین میزان فعالیت آنزیم پلی‌فنل اکسیداز در تیمار ۱۵۰ میکرومولار ملاتونین به دست آمد؛ اما اختلاف معنی‌داری با تیمار ۱۰۰ میکرومولار ملاتونین نداشت و میزان فعالیت آنزیم پلی‌فنل اکسیداز را به مقدار ۴/۶۵ درصد نسبت به تیمار شاهد افزایش داد.

پرولین

مطابق نتایج جدول تجزیه واریانس (جدول ۲)، میزان پرولین تحت‌تأثیر اثر ساده تنش کادمیوم و ملاتونین در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار شد؛ اما اثر متقابل کادمیوم × ملاتونین معنی‌دار نشد. تحت شرایط تنش کادمیوم میزان پرولین افزایش یافت طوری که در شرایط تنش ۳۰۰ میلی‌گرم در

نسخه پیش از انتشار

لیتر، میزان پرولین، ۹۱/۸۷ درصد نسبت به تیمار شاهد افزایش یافت (شکل ۸ a).

پیش‌تیمار با ملاتونین موجب افزایش میزان پرولین شد. به‌طوری‌که پیش‌تیمار با ۱۵۰ میکرومولار ملاتونین میزان پرولین را ۶۴/۲۱ درصد افزایش داد؛ اما بین سایر غلظت‌های ملاتونین اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد (شکل ۸ b).

مالون دی آلدهید

بر اساس نتایج جدول تجزیه واریانس، مالون دی آلدهید تحت‌تأثیر اثر ساده تنش کادمیوم و ملاتونین در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار شد؛ اما اثر متقابل کادمیوم × ملاتونین معنی‌دار نشد (جدول ۲). همان‌طور که در شکل ۹ a مشاهده می‌شود با افزایش غلظت تنش کادمیوم از ۱۰۰ به ۳۰۰ میلی-گرم در لیتر، میزان مالون دی آلدهید به ترتیب به میزان ۳/۱۴ و ۳۱/۲۱ درصد نسبت به تیمار شاهد افزایش یافت.

پیش‌تیمار با ملاتونین میزان مالون دی آلدهید را کاهش داد به‌طوری‌که پیش‌تیمار نمودن بذور همیشه‌بهار با ۱۵۰ میکرومولار ملاتونین سبب کاهش ۳۹/۲ درصدی میزان مالون دی آلدهید نسبت به تیمار شاهد شد (شکل ۹ b).

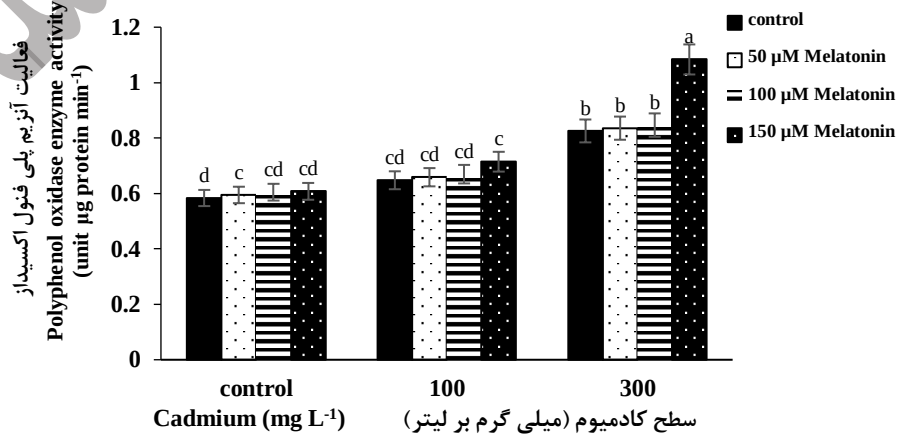
جدول ۲. تجزیه واریانس اثرات تنش کادمیوم و ملاتونین بر فعالیت بیوشیمیایی گیاهچه‌های همیشه‌بهار

Table 2. Analysis of variance of the effects of cadmium and melatonin stress on biochemical activity of marigold seedlings

منابع تغییر S.O.V	df	فعالیت آنزیم کاتالاز Catalase enzyme activity	فعالیت آنزیم پراکسیداز Peroxidase enzyme activity	فعالیت آنزیم پلی‌فنول اکسیداز Polyphenol oxidase enzyme activity	پرولین Proline	مالون دی آلدهید Malon-dialdehyde	پراکسید هیدروژن Hydrogen peroxide
تنش کادمیوم Cadmium stress (C)	2	0.0003*	0.00008**	0.29*	0.43**	0. 29**	0.0007**
ملاتونین Melatonin (M)	3	0.00002*	0.000009**	0.025**	0.0002**	0.0006**	0.00008**
تنش کادمیوم×ملاتونین M × C	6	0.000002ns	0.0000004 ns	0.011 *	0.000026ns	0.0000004 ns	0.000003**
خطا Error	24	0.000008	0.0000003	0.004	0.00004	0.000003	0.0000003
ضریب تغییرات CV %		*6.81*	*2.81*	*8.78*	*1.12*	*0.34*	*2.51*

ns، * و ** به ترتیب غیرمعنی‌دار و معنی‌دار در سطح احتمال پنج درصد، یک درصد

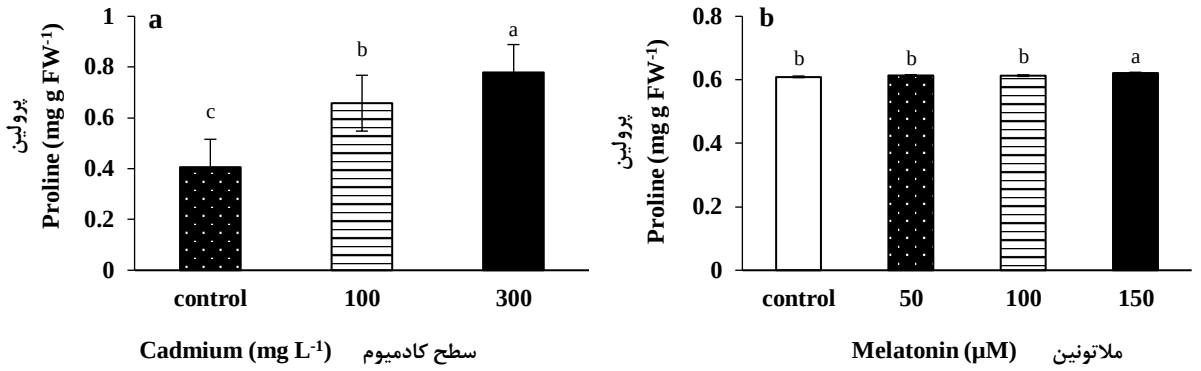
ns, * and ** are non-significant and significant at the five percent, one percent probability level, respectively



شکل ۷. تأثیر تیمار کادمیوم و ملاتونین بر فعالیت آنزیم پلی‌فنل اکسیداز گیاهچه‌های همیشه‌بهار. مقادیر میانگین سه تکرار ± انحراف معیار هستند.

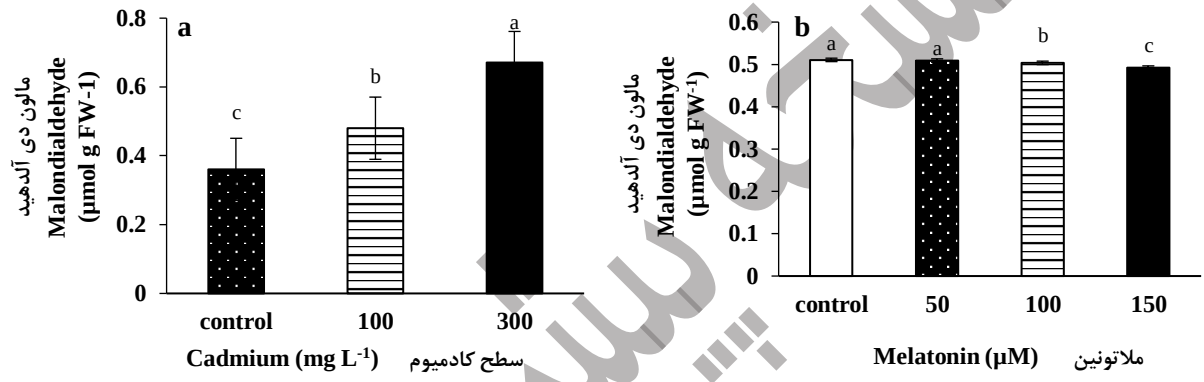
Fig. 7. The Effect of Cadmium and Melatonin on the on polyphenol oxidase enzyme activity of marigold seedlings. Values are mean ± standard deviation of three replicates.

نسخه پیش از انتشار



شکل ۸. تأثیر تیمار تنش کادمیوم (a) و ملاتونین (b) بر پرولین گیاهچه‌های همیشه‌بهار. مقادیر میانگین سه تکرار ± انحراف معیار هستند.

Fig. 8. The effect of cadmium stress treatment (a) and melatonin (b) on proline of marigold seedlings. The values are the mean values of three repetitions ± standard deviation.



شکل ۹. تأثیر تیمار تنش کادمیوم (a) و ملاتونین (b) بر مالون دی آلدهید گیاهچه‌های همیشه‌بهار. مقادیر میانگین سه تکرار ± انحراف معیار هستند.

Fig. 9. The effect of cadmium stress treatment (a) and melatonin (b) on Malondialdehyd of marigold seedlings. The values are the mean values of three repetitions ± standard deviation.

پراکسید هیدروژن

بر اساس نتایج جدول تجزیه واریانس، پراکسید هیدروژن تحت‌تأثیر اثر ساده تنش کادمیوم و ملاتونین در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار شد. همچنین اثر متقابل کادمیوم × ملاتونین در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار شد (جدول ۲). همان‌طور که در شکل ۱۰ مشاهده می‌شود در شرایط عدم پیش‌تیمار ملاتونین (تیمار شاهد ملاتونین) با افزایش غلظت تنش کادمیوم از ۱۰۰ به ۳۰۰ میلی‌گرم در لیتر میزان پراکسید هیدروژن به ترتیب به میزان ۵/۱۰ و ۳۶/۵۱ درصد نسبت به تیمار شاهد افزایش یافت. همچنین در شرایط تنش کادمیوم ۳۰۰ میلی‌گرم در لیتر، پیش‌تیمار نمودن بذور همیشه‌بهار با ۱۵۰ میکرومولار ملاتونین موجب شد تا میزان پراکسید هیدروژن به میزان ۸۲/۳۵ درصد نسبت به تیمار شاهد کاهش یابد (شکل ۱۰). کمترین میزان پراکسید هیدروژن در شرایط بدون تنش کادمیوم در بذور همیشه‌بهار پیش‌تیمار شده با ۱۵۰ میکرومولار ملاتونین مشاهده شد (شکل ۱۰).

فنل کل

نتایج حاصل از جدول تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که فنل کل تحت‌تأثیر تنش کادمیوم، ملاتونین و اثر متقابل کادمیوم × ملاتونین در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار شد (جدول ۳). نتایج نشان داد که پیش‌تیمار نمودن بذور همیشه‌بهار با ملاتونین موجب شد تا میزان فنل کل هم در شرایط بدون تنش و هم در شرایط تنش کادمیوم افزایش یابد. طوری که بیشترین میزان فنل کل (۴۹/۰۵ میلی‌گرم اسید گالیگ بر گرم وزن تر برگ) در شرایط پیش‌تیمار ۱۵۰ میکرومولار ملاتونین مشاهده شد که در تمام سطوح تنش کادمیوم (شاهد تا ۳۰۰ میلی‌گرم در لیتر) به طور معنی‌داری بیشتر از سایر تیمارها بود (شکل ۱۱). میزان فنل کل گیاهچه در بالاترین سطوح کادمیوم (۳۰۰ میلی‌گرم در لیتر) در

شرایط پیش‌تیمار ۱۵۰ میکرومولار ملاتونین مشاهده شد که نسبت به تیمار شاهد ۲۸/۳۰ درصد افزایش یافت. در تمام سطوح تنش کادمیوم، کمترین میزان فنل کل در تیمار شاهد ملاتونین مشاهده شد (شکل ۱۱).

فلاونوئید

بر اساس نتایج حاصل از جدول تجزیه واریانس داده‌ها (جدول ۳) فلاونوئید تحت تنش کادمیوم و ملاتونین و اثر متقابل کادمیوم × ملاتونین در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار شد. نتایج نشان داد که پیش‌تیمار نمودن بذور همیشه‌بهار با ملاتونین میزان فلاونوئید گیاهچه را به طور معنی‌داری در تمام سطوح کادمیوم افزایش داد. به‌طوری‌که کمترین میزان فلاونوئید در تیمار شاهد ملاتونین و بیشترین میزان فلاونوئید در تیمار ۱۵۰ میکرومولار ملاتونین مشاهده شد (شکل ۱۲).

در شرایط تنش کادمیوم ۳۰۰ میلی‌گرم در لیتر، تیمار ۱۵۰ میکرومولار ملاتونین میزان فلاونوئید را ۱۴/۵۱ درصد، تیمار ۱۰۰ میکرومولار ملاتونین میزان فلاونوئید را ۱۰/۱۹ درصد و تیمار ۵۰ میکرومولار ملاتونین میزان فلاونوئید را ۷/۲۸ درصد نسبت به تیمار شاهد افزایش داد (شکل ۱۲).

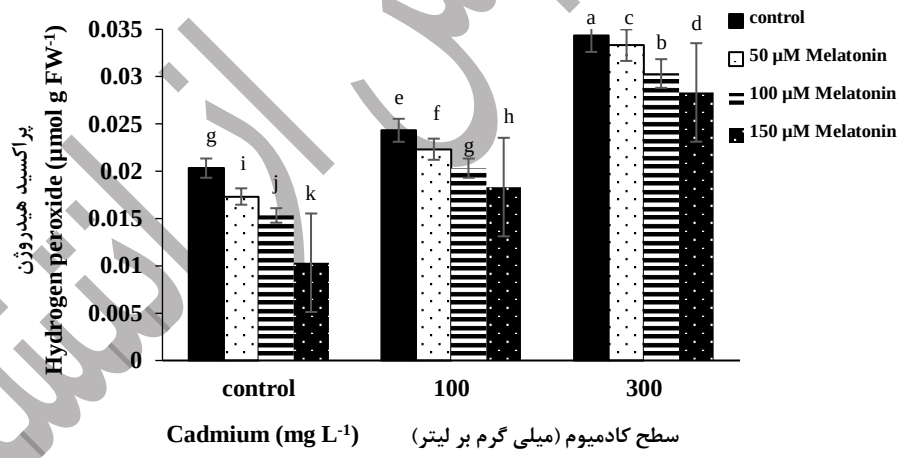
جدول ۳. تجزیه واریانس اثرات تنش کادمیوم و ملاتونین بر متابولیت‌های ثانویه گیاهچه‌های همیشه‌بهار

Table 3. Analysis of variance of the effects of cadmium and melatonin stress on secondary metabolites of marigold seedlings

منابع تغییر S.O.V	df	فنل کل Total phenol	فلاونوئید Flavonoid
تنش کادمیوم Cadmium stress (C)	2	998.85**	835.62 **
ملاتونین Melatonin (M)	3	162.79 **	59.23 **
ملاتونین× تنش کادمیوم M × C	6	1.90 **	0.99 **
خطا Error	24	0.38	0.27
ضریب تغییرات CV %		*1.81*	*1.17*

** معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد

**Significant at the one percent probability level

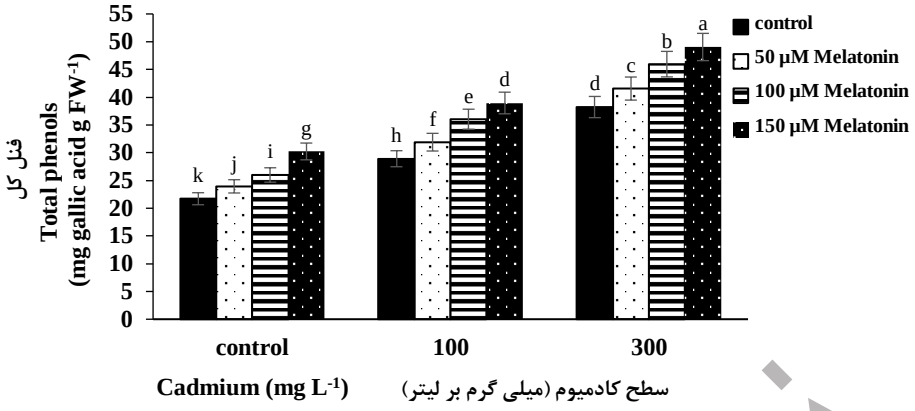


شکل ۱۰. تأثیر تیمار کادمیوم و ملاتونین بر پراکسید هیدروژن گیاهچه‌های همیشه‌بهار. مقادیر میانگین سه تکرار ± انحراف معیار هستند.

Fig. 10. The Effect of Cadmium and Melatonin on the Hydrogen peroxide of marigold seedlings. Values are mean ± standard deviation of three replicates.

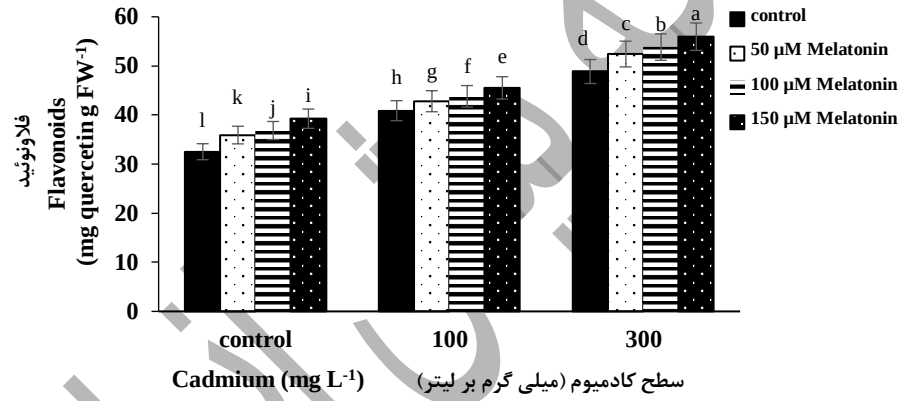
بحث

در مطالعه حاضر، تأثیر مثبت ملاتونین بر گیاهچه همیشه‌بهار در شرایط سمیت کادمیوم در شرایط آزمایشگاهی بررسی شد. بر اساس نتایج این پژوهش درصد جوانه‌زنی بذور همیشه‌بهار با افزایش غلظت کادمیوم کاهش یافته است که با نتایج شیخ-زاده و همکاران (Sheikhzadeh et al, 2021) روی گیاه گاوزبان (*Borago officinalis*)، سیلوا و همکاران (Silva, et al, 2021) روی پنبه (*Gossypium hirsutum*) مطابقت داشت. پیش‌تیمار بذور همیشه‌بهار با ملاتونین موجب شد تا درصد جوانه‌زنی بذور هم در شرایط بدون تنش و هم در شرایط تنش کادمیوم افزایش یابد. کاربرد ملاتونین، انتقال



شکل ۱۱. تأثیر تیمار کادمیوم و ملاتونین بر فنل کل گیاهچه‌های همیشه‌بهار. مقادیر میانگین سه تکرار ± انحراف معیار هستند.

Fig. 11. The Effect of Cadmium and Melatonin on the Total phenols of marigold seedlings under cadmium stress. Values are mean ± standard deviation of three replicates.



شکل ۱۲. تأثیر تیمار کادمیوم و ملاتونین بر فلاونوئید گیاهچه‌های همیشه‌بهار. مقادیر میانگین سه تکرار ± انحراف معیار هستند

Fig. 12. The Effect of Cadmium and Melatonin on the Flavonoidsof marigold seedlings under cadmium stress. Values are mean ± standard deviation of three replicates.

کادمیوم به برگ‌ها را کاهش می‌دهد، دفاع آنتی‌اکسیدانی را فعال و سطح گلوتاتیون و آسکوربات را افزایش می‌دهد. در نتیجه، ملاتونین آسیب اکسیداتیو ناشی از کادمیوم به دستگاه فتوسنتزی را کاهش داد و منجر به افزایش فتوسنتز، فعالیت روبیسکو و متابولیسم کربوهیدرات می‌شود (Khan et al., 2025). میانگین مدت جوانه‌زنی همچنین با کیفیت توده بذری رابطه عکس دارد، بنابراین هر چه میانگین مدت جوانه-زنی بذر کمتر باشد، نمونه بذری از کیفیت بیشتری برخوردار است. می‌توان بیان نمود که ملاتونین با بهبود فرایند جوانه‌زنی موجب افزایش سرعت جوانه‌زنی و کاهش میانگین مدت‌زمان جوانه‌زنی گردید که این موضوع نشان‌دهنده افزایش قدرت بذر همیشه‌بهار با کاربرد ملاتونین است. اگر بذر قادر به جذب رطوبت نباشد یا اختلالی در جذب آب ایجاد شود، فعالیت‌های متابولیکی مرتبط با جوانه‌زنی در داخل بذر کند شده و مدت‌زمان لازم برای خروج ریشه افزایش می‌یابد. تحت شرایط تنش، علاوه بر کاهش جذب آب در مرحله آب‌نوشی و استقرار گیاهچه، یون‌های اضافی نیز جذب می‌شوند که موجب ایجاد پتانسیل اسمزی و در نهایت تأخیر در جوانه‌زنی و ظهور ریشه می‌گردد (Mousavi and Omidi, 2021). کاهش جوانه‌زنی بذر توسط کادمیوم در گیاهان شنبلیله (*Trigonella foenum*-graecum) (Zayneb et al., 2015) و زیره سبز (*Cuminum cyminum*) (Salarizadeh et al., 2016) نشان داده شده است. کاهش جوانه‌زنی بذر ممکن است به اثرات منفی کادمیوم بر جذب و حرکت آب یا تجزیه و یا تغییر

در ویژگی‌های نفوذپذیری غشای سلولی مرتبط باشد (Salarizadeh et al., 2016). کاهش درصد جوانه‌زنی روزانه در اثر سمیت مس در کاهو گزارش شده است (Shams et al., 2018).

پیش‌تیمار باعث ایجاد تغییرات زیستی و فیزیولوژیکی قابل‌توجهی در بذر و گیاه حاصل از آن می‌شود، به‌طوری‌که اثرات آن در افزایش درصد جوانه‌زنی، استقرار اولیه گیاه، تسریع رسیدگی و بهبود کمیت و کیفیت محصول قابل‌مشاهده است. مرحله جوانه‌زنی بذر اهمیت ویژه‌ای در تعیین تراکم نهایی بوته‌ها در واحد سطح دارد، زیرا دستیابی به تراکم مناسب مستلزم جوانه‌زنی کامل و با سرعت کافی بذرهاست. گزارش‌های رحمان و همکاران (Rehman, et al, 2019) نشان داده است که خیساندن بذر کدو (*Cucurbita pepo*) موجب افزایش درصد جوانه‌زنی، کاهش میانگین مدت‌زمان جوانه‌زنی و کاهش روند پیری بذر می‌شود. تحت تنش سرب، محلول‌پاشی ملاتونین به مدت ۳۰ روز روی پنجه مرغی (*Cynodon dactylon*) موجب افزایش بیوماس و کلروفیل، ترمیم ساختار غشاهای تیلاکوئیدی، ارتقای کارایی فتوسنتز و کاهش تنش اکسیداتیو شد. ملاتونین با بازسازی رنگ‌دانه‌های فتوسنتزی و بهبود ساختار کلروپلاست، راندمان فتوسنتز و عملکرد فتوسیستم II را افزایش داد. علاوه بر این، با کاهش تجمع بیش از حد گونه‌های فعال اکسیژن، به افزایش تولید زیست‌توده کمک کرد (Xie et al., 2021). نتایج تحقیق وانگ و همکاران (Wang et al., 2022) نیز نشان داد که استفاده از ملاتونین در گیاه یولاف تحت تنش سرب می‌تواند محتوای کلروفیل را افزایش داده و در نتیجه کارایی فرایند فتوسنتز را بهبود دهد. کاهش سرعت جوانه‌زنی بذر توسط کادمیوم در گیاهان شنبلیله (*Trigonella foenum-graecum*) (Zayneb et al., 2015) و زیره سبز (*Cuminum cyminum*) (Salarizadeh et al., 2016) نشان داده شده است. کاهش جوانه‌زنی در بذر ممکن است به دلیل تأثیرات منفی کادمیوم بر جذب و انتقال آب، تجزیه یا تغییر در ویژگی‌های نفوذپذیری غشای سلولی باشد (Zayneb et al., 2015; Salarizadeh et al., 2016). تنش کادمیوم باعث کاهش طول گیاهچه شد که با نتایج شیخ‌زاده و همکاران (Sheikhzadeh, et al., 2021) روی گیاه گاوزبان (*Borago officinalis*)، سیلوا و همکاران (Silva, et al., 2021) روی پنبه (*Gossypium hirsutum*) مطابقت داشت. افزایش در شاخص‌ها رشد گیاهان تحت تنش کادمیوم در پاسخ به ملاتونین ممکن است با تغییراتی در مواد معدنی و نقش حفاظتی غشا مرتبط باشد که تحمل گیاه را در برابر آسیب افزایش می‌دهد؛ بنابراین، نتایج نشان می‌دهد که طول گیاهچه تا حدی بیانگر تحمل گیاه به تنش‌های کادمیوم است. کادمیوم به دلیل ماهیت متحرک خود از طریق ریشه وارد گیاه می‌شود و با استفاده از ناقلان مختلف در آوند چوبی و آوند آبکش به‌صورت یون به شاخه‌ها منتقل می‌گردد. ورود کادمیوم به آوند چوبی از مسیرهای آپوپلاستی و سیمپلاستی انجام می‌شود و در نهایت به شاخه‌ها می‌رسد (Dong et al., 2019). جذب بیش از حد یون‌های کادمیوم توسط ریشه و انتقال آن‌ها به اندام‌های هوایی منجر به بروز تغییرات پیچیده‌ای در گیاهان در سطوح مختلف می‌شود (Salarizadeh et al., 2016).

مهار رشد توسط کادمیوم می‌تواند به علت مهار تقسیم سلولی و سرعت طویل شدن سلول‌ها باشد که اغلب توسط مهار غیرقابل‌برگشت پمپ پروتون که مسئول این فرایند است، رخ می‌دهد (Amooaghaie et al., 2013) که با نتایج امجد و همکاران (Amjad et al., 2021) روی گیاه کینوا مطابقت دارد. مطالعات متعددی نشان داده‌اند که تنش کادمیوم باعث کاهش قابل‌توجه رشد گیاهان می‌شود (Panda et al., 2017; Rehman et al., 2019). به طور مشابه، امجد و همکاران (Amjad et al., 2021)گزارش کردند که با افزایش غلظت کادمیوم خاک از ۳۰ به ۹۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم، رشد گیاه کینوا به طور قابل‌توجهی کاهش می‌یابد. این کاهش رشد ناشی از کادمیوم به عوامل متعددی مانند اختلال در جذب مواد مغذی، سمیت یون کادمیوم، محدودیت در روابط آبی گیاه، کاهش کارایی فرایند فتوسنتزی و کاهش فعالیت‌های آنزیمی نسبت داده می‌شود (Rehman et al., 2019; Abdal et al., 2021).

کاربرد ملاتونین در کلزا با تقویت فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، افزایش زیست‌توده و بهبود نرخ فتوسنتز، توان گیاه را در برابر تنش کادمیوم بالا برد (Sami et al., 2020). همچنین در پژوهشی بر روی برنج (*Oryza sativa* L.) استفاده از ملاتونین موجب کاهش اثرات سمی ترکیب سرب و کادمیوم شد. قرارگرفتن گیاه تحت تنش کادمیوم باعث افزایش تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) مانند O^{2-} و H_2O_2 می‌شود که در صورت عدم کنترل به پراکسیداسیون لیپیدها، تخریب غشاها و آسیب به پروتئین‌ها و DNA منجر می‌گردد. مطالعات جدید نشان می‌دهند که این افزایش ROS

نه‌تنها علامتی از آسیب است، بلکه به‌عنوان سیگنال آغازگر فعال‌سازی مسیرهای دفاعی عمل می‌کند. در پنبه، ملاتونین (۱۰۰ میکرومولار) بذرهای از پیش خیسانده شده، سرعت و پتانسیل جوانه‌زنی، طول و وزن تر رادیکال‌های آزاد، SOD، POD، فعالیت آلفا آمیلاز را افزایش و محتوای H_2O_2، رادیکال آنیون سوپراکسید (O^{2-}) و MDA را تحت تنش خشکی کاهش داد (Bai et al., 2020).

افزایش بیش از حد فعالیت این آنزیم احتمالاً به دلیل توانایی آن در تبدیل رادیکال‌های سوپراکسید به H_2O_2 است (Rehman et al., 2019; Shahid et al., 2011). همچنین، گزارش‌های متعدد افزایش فعالیت آنزیم کاتالاز را در گیاهان کینوا تحت تنش فلزات سنگین تأیید کرده‌اند (Abdal et al., 2021; Iftikhar et al., 2021). سمیت H_2O_2 زمانی کاهش می‌یابد که این مولکول به اکسیژن مولکولی و آب تجزیه شود؛ فرایندی که از طریق افزایش بیان آنزیم‌های کاتالاز و پراکسیداز صورت می‌گیرد و نقش مهمی در سم‌زدایی H_2O_2 دارد (Amjad et al., 2021: Shahid et al., 2019). بروز تنش اکسیداتیو ناشی از کادمیوم و آسیب غشایی ناشی از آن در بسیاری از گونه‌های گیاهی گزارش شده است (Rasafi et al., 2021; Kaya et al., 2021; Murtaza et al., 2019). مطالعه ویتلی و همکاران (Vitelli et al., 2024) گزارش می‌دهد که گیاهان سبزی در پاسخ به کادمیوم با تنظیم بیان ژن‌های آنتی‌اکسیدانی، ژن‌های متالوتیونین (MTs) و ژن‌های حمل‌کننده‌های یون فلز مانند (HMA, NRAMP, YSL) مقاومت خود را افزایش می‌دهند در نتیجه، مشاهده افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مانند Superoxide dismutase (SOD)، Catalase (CAT) و Ascorbate peroxidase (APX) تحت تنش کادمیوم می‌تواند نشانه‌ای از «پاسخ تنظیمی» گیاه باشد. یعنی صرفاً کاهش آسیب نیست، بلکه افزایش ظرفیت دفاعی از طریق مسیرهای سیگنالینگ و بیان ژن است. نتایج مطالعه و الهربی همکاران (Alharby et al., 2021) نشان می‌دهد که فعالیت‌های CAT، APX و POD روند افزایشی بر سمیت کادمیوم را نشان می‌دهد. مطالعه حاضر نشان داد که تحت تنش کادمیوم فعالیت هر دو این آنزیم افزایش یافته است. افزایش‌های مشابهی در فعالیت این آنزیم‌ها نیز تحت تنش کادمیوم هم در آزمایش‌های خاک و هم در کشت محلول در کینوا (Amjad et al., 2021; Abdal et al., 2021; Iftikhar et al., 2021) و همچنین گیاهان دیگر مشاهده شد (Rehman et al., 2019; Shahid et al., 2019)؛ بنابراین، می‌توان استنباط کرد که هر دو آنزیم کاتالاز و پراکسیداز نقش مهمی در سم‌زدایی H_2O_2 و آسیب سلولی حاصل در گیاهان تحت تنش کادمیوم دارند (Abdal et al., 2021; Iftikhar et al., 2021). کادمیوم با اختلال در تعادل یونی سلول و ایجاد تنش اکسیداتیو، تولید گونه‌های اکسیژن فعال (ROS) را افزایش می‌دهد. گیاه برای مقابله، سیستم آنتی‌اکسیدانی خود را فعال می‌کند. افزایش فعالیت CAT، APX و POD نشانه‌ی تلاش سلول برای تجزیه‌ی H_2O_2 و حفظ تعادل رداکس (تعادل اکسایش-کاهش) است. تفاوت مقیاس این افزایش‌ها بین مطالعات مختلف ممکن است ناشی از درجه‌ی حساسیت گونه، غلظت و مدت تنش، و شرایط کشت (خاک یا هیدروپونیک) باشد که روی میزان نفوذ و جذب کادمیوم تأثیر می‌گذارد. افزایش فعالیت آنزیم پراکسیداز توسط پای و شارما (Pai and Sharma, 2023) در برنج گزارش شده است. تنش کادمیوم موجب تغییرات متفاوتی در فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی شامل کاتالاز، سوپراکسید دیسموتاز، پراکسیداز و پلی‌فنل اکسیداز می‌شود (Kamalvand et al., 2022). قرارگرفتن گیاه در معرض تنش‌هایی مانند کادمیوم سبب برهم‌خوردن تعادل یونی شده و تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) را تحریک می‌کند؛ این امر به آسیب غشای سلولی و اندامک‌ها منجر شده و از طریق تغییر در سیگنال‌دهی مولکولی، تنظیم اسمزی و تولید متابولیت‌های ثانویه، فعالیت متابولیکی سلول را مختل می‌سازد. برای مقابله با این شرایط، گیاه با فعال‌سازی سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی متشکل از ترکیبات آنتی‌اکسیدانی آنزیمی و غیرآنزیمی به خنثی‌سازی اثرات زیان‌بار ROS می‌پردازد (Ullah et al., 2019). داوودا و همکاران (Dawuda et al., 2020) گزارش کردند که کاربرد ۱۰۰ میلی‌مولار $CdCl_2$ در گیاه کاهو باعث افزایش فعالیت پراکسیداز و پلی‌فنل اکسیداز در ریشه و برگ شد. همچنین، افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در گیاه یونجه تحت تنش کادمیوم تأیید شده است (Pakbaz et al., 2023).

نتیجه‌گیری نهایی

یافته‌های این پژوهش نشان می‌دهد که کاربرد ملاتونین می‌تواند در بهبود درصد جوانه‌زنی بذور همیشه‌بهار تحت تنش کادمیوم مؤثر باشد. این اثر احتمالاً از طریق تقویت

سامانه‌های آنتی‌اکسیدانی و کاهش تنش اکسیداتیو صورت می‌گیرد. با این‌حال، برای تأیید دقیق سازوکارهای مولکولی و فیزیولوژیکی ملاتونین و ارزیابی کامل نقش آن در بهبود تحمل گیاه به سمیت فلزات سنگین، انجام آزمایش‌های تکمیلی شامل اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های کلیدی، بررسی بیان ژن‌ها و ارزیابی رشد در مراحل بعدی گیاه ضروری است؛ بنابراین، ملاتونین به‌عنوان یک ترکیب زیستی امیدوارکننده در مدیریت تنش‌های فلزی شناخته می‌شود، اما تحقیقات بیشتر برای استفاده عملی در کشاورزی پایدار موردنیاز است.

سپاسگزاری

بدین‌وسیله نویسندگان این مقاله برخورد لازم می‌دانند که از تمامی افرادی که در اجرای پژوهش همکاری داشتند تشکر و قدردانی را نمایند.

منابع

Abdal, N., Abbas, G., Asad, S.A., Ghfar, A.A., Shah, G.M., Rizwan, M., Ali, S., Shahbaz, M., 2021 Salinity mitigates cadmi-um-induced phytotoxicity in quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd) by limiting the Cd uptake and improved responses to ox-idative stress: Implications for phytoremediation. Environmental Geochemistry and Health, 1–15. https://doi.org/ 10.1007/s10653-021-01082-y

Aebi, H., 1984 Catalase in vitro. Methods in Enzymology. 105, 121-126. https://doi.org/10.1016/s0076-6879(84)05016-3

Alexieva, V., Sergei, I., Mapelli, S., Karanov, E., 2001. The effect of drought and ultraviolet radiation on growth and stress markers in pea and wheat. Plant, Cell and Environment. 24, 1337- 1344 https://doi.org/10.1046/j.1365-3040.2001.00778.x

Alharby, HF. Al-Zahrani, HS. Abbas, G., 2022. Potassium and silicon synergistically increase cadmium and lead tolerance and phytostabilization by quinoa through modulation of physiological and biochemical attributes. Toxics. 10,169. https://doi.org/10.3390/toxics10040169

Amjad, M., Iqbal, M.M., Abbas, G., Farooq, A.B.U., Naeem, M.A., Imran, M., Murtaza, B., Nadeem, M., Jacobsen, S.-E., 2021 Assessment of cadmium and lead tolerance potential of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd) and its implications for phy-toremediation and human health. Environmental Geochemistry and Health, 1–14. https://doi.org/10.1007/s10653-021-00826-0

Amooaghaie, R., Marefat, E., Shabani, L., 2013 Interaction of salicylic acid and cadmium on growth, photosynthetic pigments and ion distrubiution in arial parts of soybean plantlets. Journal of Plant Biological Sciences, 4, 75-88. [in Persian] https://doi.org/20.1001.1.20088264.1391.4.14.8.5

Bao, Q., Bao, W., Li, Y., Zhang, S., Lian, F., Huang, Y., 2021. Silicon combined with foliar melatonin for reducing the absorption and translocation of Cd and As by *Oryza sativa* L. in two contaminated soils. Journal of Environmental Management. 287, 112343. https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2021.112343

Bates, L.S., Walderen, R.D., Taere, I.D., 1973. Rapid determination of free proline for water stress studies. Plant and Soil. 39, 205-207. http://dx.doi.org/10.1007/BF00018060

Bai, Y., Xiao, S., Zhang, Z., Zhang, Y., Sun, H., 2020. Melatonin improves the germination rate of cotton seeds under drought stress by opening pores in the seed coat. Peer Journal. 8, e9450 https://doi.org/10.7717/peerj.9450

Beiranvand, Z. Amiri, H. Khodayari, H., 2024. The effect of melatonin and serotonin on photosynthetic parameters in two rapeseed Canola cultivars under lead stress. Journal of Plant Biological Sciences. 15, 23-50. [In Persian]. https://doi.org/10.22108/ijpb.2024.142184.1371

Campos, C.N., Ávila, R.G., de Souza, K.R.D., Azevedo, L.M., Alves, J.D., 2019. Melatonin reduces oxidative stress and promotes drought tolerance in young (*Coffea arabica* L.) plants. Agricultural Water Management. 211, 37-47. https://doi.org/10.1016/j.agwat.2018.09.025

Chang, C.J., Kao, C.H. 1998. H_2O_2 metabolism during senescence of rice leaves: changes in enzyme activities in light and darkness. Plant Growth Regulation. 25, 11-15. https://doi.org/10.1023/A:1005903403926.

Dawuda, MM., Liao, W., Hu, L., Yu, J., Xie, J., Calderón-Urrea, A., Wu, Y., Tang, Z., 2020 Foliar application of abscisic acid mitigates cadmium stress and increases food safety of cadmium-sensitive lettuce (*Lactuca sativa* L.) genotype. Peer Journal. 8, e9270. https://doi.org/10.7717/peerj.9270

De Caroli, M., Furini, A., Dalcorso, G., Rojas, M., Sansebastiano, G.P.D., 2020 Endomembrane Reorganization Induced by Heavy Metals. Plant. 9, 482. https://doi.org/ 10.3390/plants9040482

Dong, Q., Fang, J., Huang, F., Cai, K., 2019. Silicon amendment reduces soil cd availability and Cd uptake of two *Pennisetum* species. International Journal of Environmental Research and Public Health. 6, 1624. https://doi.org/ 10.3390/ijerph16091624

Ellis, R.H., Roberts, E.H., 1981. The quantification of ageing and survival in orthodox seeds. Seed Science and Technology. 9, 373-409.

Gu, Q., Chen, Z., Yu, X., Cui, W., Pan, J., Zhao, G., Shen, W., 2017. Melatonin confers plant tolerance against cadmium stress via the decrease of cadmium accumulation and reestablishment of microRNA-mediated redox homeostasis. Plant Science. 261, 28-37. https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2017.05.001

Heath, R.L., Packer, L., 1968. Photo per oxidation in isolated chloroplast, kinetics and stoichiometry of fatty acid per oxidation. Biochemistry Biopsy. 125, 189-198

Hoque, M.N., Tahjib-Ul-Arif, M., Hannan, A., Sultana, N., Akhter, S., Hasanuzzaman, M., Brestič, M., 2021. Melatonin modulates plant tolerance to heavy metal stress: morphological responses to molecular mechanisms. International Journal of Molecular Sciences, 22, 11445. https://doi.org/10.3390/ijms222111445

Iftikhar, A., Abbas, G., Saqib, M., Shabbir, A., Amjad, M., Shahid, M., Ahmad, I., Iqbal, S., Qaisrani, S.A., 2021. Salinity modulates lead (Pb) tolerance and phytoremediation potential of quinoa: A multivariate comparison of physiological and biochemical attributes. Environmental Geochemistry and Health. 2021, 44, 257–272. https://doi.org/10.1007/s10653-021-00937-8

ISTA., 2017 International Rules for Seed Testing. International Seed Testing Association, Bassersdorf, Switzerland. https://www.scirp.org/reference/referencespapers?referenceid=2409416

Jawad Hassan, M., Ali Raza, M., Ur Rehman, S., Ansar, M., Gitari, H., Khan, I., Wajid, M., Ahmed, M., Abbas Shah, G., Peng. Y., Li, Z., 2020. Effect of cadmium toxicity on growth, oxidative damage, antioxidant defense system and cadmium accumulation in two sorghum cultivars. The Plant Journal. 9,1575. https://doi.org/ 10.3390/plants9111575

Kamalvand, A., Hosseini Sarghein, S., Karamian, R., 2022 Impact of cadmium stress on growth and physiological responses of fenugreek (*Trigonella foenum*-graecum L.). Journal of Plant Physiology and Breeding. 12, 51-65. https://doi.org/10.22034/jppb.2022.15483

Karimi M, Ghorbanalizade F, Eslami M., 2024. Effect of melatonin on enzyme activity and salinity tolerance of calendula (*Calendula officinalis* L.) based on the evaluation of morphophysiological characteristics. Plant Process and Function. 13, 347-360. [in Persian] https://doi.org/10.22034/13.62.347

Kaya, C., 2021 Salicylic acid-induced hydrogen sulphide improves lead stress tolerance in pepper plants by upraising the ascorbateglutathione cycle. Physiologia Plantarum, 173, 8–19. https://doi.org/10.1111/ppl.13159

Khan, A., Liu, D., Jie, Z., Ullah, N., Khan, A., Ullah, F., Liu, P., Ibrahimova, U., Ahmad, I., 2025. Pre-treatment of roots with melatonin triggers a key tolerance mechanism underlying cadmium stress in cotton seedlings. Industrial Crops and Products. 228, 120870. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2025.120870

Lv, X., Y. Fang, L. Zhang, W. Zhang, L. Xu, J. Han, B. Jin, X. Zhang D. Xue., 2019. Effects of melatonin on growth, physiology and gene expression in rice seedlings under cadmium stress. Phyton. 88, 91. https://doi.org/10.32604/phyton.2019.06622

Ma, X., Zhang, J., Burgess, P., Rossi, S., & Huang, B., 2018. Interactive effects of melatonin and cytokinin on alleviating drought-induced leaf senescence in creeping bentgrass (*Agrostis stolonifera*). Environmental and Experimental Botany. 145, 1–11. https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2017.10.010

Maehly, A.C., 1955. Assay of catalase and peroxidase. Methods in Enzymology. 2, 764-

775. https://doi.org/10.1002/9780470110171.ch14

Mahmoudi, F. , Shikhzadehmosadegh, P., Zare, N. Esmailpour, B., 2023. Effect of seed pretreatment with salicylic acid on seed germination, growth and biochemical indices of quinoa seedlings (*Chenopodium quinoa* willd.) under cadmium stress. Journal of Plant Biological Sciences, 15, 1-26. [in Persian]. https://doi.org/10.22108/ijpb.2024.138548.1330

Mahmoudi, F., Sheikhzadeh Mosaddegh, P., Zare, N., Esmaielpour, B., 2019. Improvement of seed germination, growth and biochemical characteristics of Borage (*Borago officinalis* L.) seedlings with seed priming under cadmium stress conditions. Journal of Plant Biological Sciences, 11, 23-42. [in Persian]. https://doi.org/10.22108/ijpb.2019.111889.1104.

Menichini, F., Tundis, R., Bonesi, M., Loizzo, M. R., Conforti, F., Statti, G., De Cindio, B., Houghton, P.J., Menichini, F., 2009. The influence of fruit ripening on the phytochemical content and biological activity of *Capsicum chinense* Jacq. cv Habanero. Food Chemistry. 114(2), 553–560. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.09.086

Miri, M., Amerian, M.R., Edalat, M., Baradaran Firouzabadi, M., Makarian, H., 2023. The effect of seed pretreatment and foliar application of melatonin and spermidine on germination and physicochemical traits of kodo (*Fagopyum esculentum* Moenc) under drought stress. Environmental Stresses in Crop Sciences. 16, 315-331. [in Persian]. https://doi.org/10.22077/escs.2022.4577.2043

Mousavi, S.E., Omidi, H., 2021. Effect of biological pre-treatment of seed on germination and growth indices and pigments of flaxseed (*Linum usitatissimum* L.) under salinity stress. Iranian journal of Seed Science and Technology. 10, 133-144. [in Persian] https://doi.org/10.22034/ijsst.2021.343191.1349

Murtaza, B., Naeem, F., Shahid, M., Abbas, G., Shah, N.S., Amjad, M., Bakhat, H.F., Imran, M., Niazi, N.K., Murtaza, G., 2019. A multivariate analysis of physiological and antioxidant responses and health hazards of wheat under cadmium and lead stress. Environmental Science and Pollution Research. 26, 362–370. https://doi.org/10.1007/s11356-018-3605-7

Nawaz, K., Chaudhary, R., Sarwar, A., Ahmad, B., Gul, A., Hano, C., Abbasi, B. H., Anjum, S., 2021. Melatonin as master regulator in plant growth, development and stress alleviator for sustainable agricultural production: Current status and future perspectives. Sustainability. 13(1), 294. https://doi.org/10.3390/su13010294

Olennikov, D.N., Kashchenko, N.I., 2022. Diversity and separation methods of *Calendula* genus phytochemicals from 1891 to 2022. Molecules. 27(23), 8626. https://doi.org/10.3390/molecules27238626

Pai, R., Sharma, P.K., 2023. Exogenous application of salicylic acid mitigates salt stress in rice seedlings by regulating plant water status and preventing oxidative damage. Environmental and Ecotoxicology Biology. 20, 193–204. https://doi.org/10.22364/eeb.20.18

Pakbaz, Z., Ebrahimi, A., Ben, C., 2023 Genetic control and molecular responses of *Medicago truncatula* to cadmium stress. Euphytica. 219, 84. https://doi.org/10.1007/s10681-023-03200-6

Panda, A., Rangani, J., Kumari, A., Parida, A., 2017. Efficient regulation of arsenic translocation to shoot tissue and modulation of phytochelatin levels and antioxidative defense system confers salinity and arsenic tolerance in the Halophyte *Suaeda maritima*. Ecotoxicology and Environmental Safety. 143, 149–171. https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2017.09.007

Rajpar. I., Khanif, Y.M. Memon. A.A., 2006. Effect of seed priming on growth and yield of wheat (*Triticum aestivum* L.) under non-saline conditions. International Journal of Agricultural Research. 1, 259-264. https://doi.org/10.3923/ijar.2006.259.264

Rasafi, T.E., Oukarroum, A., Haddioui, A., Song, H., Kwon, E.E., Bolan, N., Tack, F.M., Sebastian, A., Prasad, M.N.V., Rinklebe, J., 2021. Cadmium stress in plants: A critical review of the effects, mechanisms, and tolerance strategies. Critical Reviews in Environmental Science and Technology. 52, 1–52. https://doi.org/10.1080/10643389.2020.1835435

Rehman, H., Iqbal, H., Basra, S.M.A., Afzal, I., Farooq, M., Wakeel, A., Ning, W., 2019. Seed priming improves early seedling vigor, growth and productivity of spring maize. Journal of International Agriculture. 14, 1745–1754. https://doi.org/10.1016/S2095-3119(14)61000-5

Ren, S., Rutto, L., Katuuramu, D., 2019. Melatonin acts synergistically with auxin to promote lateral root development through fine tuning auxin transport in *Arabidopsis thaliana*. PLoS ONE. 14, 0221687. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0221687

Salarizadeh, S., Kavousi, H.R., Pourseyadi, S., 2016. Effect of cadmium on germination characters and biochemical parameters of two Iranian ecotypes of cumin (*Cuminum cyminum* L.). Journal of Medicinal Plants and By-Products, 5, 15-22. https://doi.org/10.22092/jmpb.2016.108919

Sami, A., Shah, F.A., Abdullah, M., Zhou, X., Yan, Y., Zhu, Z., Zhou, K., 2020. Melatonin mitigates cadmium and aluminium toxicity through modulation of antioxidant potential in *Brassica napus* L. Plant Biology. 22(4), 679–690. https://doi.org/10.1111/plb.13093

Savic Gajic, I.M., Savic, I.M., Skrba, M.; Dosić, A., Vujadinovic, D., 2022. Food additive based on the encapsulated pot marigold (*Calendula officinalis* L.) flowers extract in calcium alginate microparticles. Journal of Food Processing and Preservation. 46, e15792. https://doi.org/10.1111/jfpp.15792

Shahid, M., Farooq, A.B.U., Rabbani, F., Khalid, S., Dumat, C., 2019. Risk assessment and biophysiochemical responses of spinach to foliar application of lead oxide nanoparticles: A multivariate analysis. Chemosphere. 245, 125605. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.125605

Shahid, M., Pinelli, E., Pourrut, B., Silvestre, J., Dumat, C., 2011. Lead-induced genotoxicity to *Vicia faba* L. roots in relation with metal cell uptake and initial speciation. Ecotoxicology and Environmental Safety. 74, 78–84. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2010.08.037

Shams, M., YildirimI, E., Agar, G., Ercisli, S., Dursun, A., Ekinci, M., Kul, R., 2018. Nitric oxide alleviates copper toxicity in germinating seed and seedling growth of *Lactuca sativa* L. Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca. 46, 167–172. https://doi.org/10.15835/nbha46110912

Sharma, A., Sidhu, G.P., Araniti, F., Bali, A.S., Shahzad, B., Tripathi, D.K., Brestic, M., Skalicky, M., Landi, M., 2020. The role of salicylic acid in plants exposed to heavy metals. Molecules. 25, 540. https://doi.org/10.3390/molecules25030540

Sheikhzadeh, P., Zare, N., Mahmoudi, F., 2021. The synergistic effects of hydro and hormone priming on seed germination, antioxidant activity and cadmium tolerance in borage. Acta Botanica Croatica. 80, 18–28. https://doi.org/10.37427/botcro-2021-007

Silva, P., Guilherme, M., Guilherme, L., Santos-Oliveira, J., da Silva, E., 2021. Evaluation of seed germination development and initial growth of cotton plants exposed to cadmium. Anales de Biología. 43, 111-116. https://doi.org/10.6018/analesbio.43.11

Singhal, R.K., Kumar, M., Bose, B., Mondal, S., Srivastava, S., Dhankher, O.P., Tripathi, R.D., 2022. Heavy metal (loid)s phytotoxicity in crops and its mitigation through seed priming technology. International Journal of Phytoremediation. 1-20. https://doi.org/10.1080/15226514.2022.2068502

Sohrabi F, Seyed hajizadeh H, BaserKouchebagh S, Rasouli F., 2024. The effect of seed irradiation on germination, growth and quantitative and qualitative characteristics of pot marigold (*Calendula officinalis*). Plant Process and Function. 13, 18 [in Persian] http://jispp.iut.ac.ir/article-1-2069-fa.html

Ullah, I., Al-Johny, B.O., Al-Ghamdi, K.M., Al-Zahrani, H.A.A., Anwar, Y., Firoz, A., Al-Kenani, N., Almatry, M.A.A., 2019. Endophytic bacteria isolated from *Solanum nigrum* L., alleviate cadmium (Cd) stress response by their antioxidant potentials, including SOD synthesis by sodA gene. Ecotoxicology and Environmental Safety. 174, 197-207. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.02.074

Vitelli, V., Giamborino, A., Bertolini, A., Saba, A., Andreucci, A., 2024. Cadmium stress signaling pathways in plants: Molecular responses and mechanisms. Current Issues in Molecular Biology. 46, 6052-6068. https://doi.org/10.3390/cimb46060361

Wang, K., He, J., Zhao, N., Zhao, Y., Qi, F., Fan, F., Wang, Y., 2022. Effects of melatonin on

growth and antioxidant capacity of naked oat (*Avena nuda* L.) seedlings under lead stress. PeerJ. 10, Article e13978. https://doi.org/10.7717/peerj.13978

Wang, M., Duan, S., Zhou, Z., Chen, S., Wang, D., 2019. Foliar spraying of melatonin confers cadmium tolerance in *Nicotiana tabacum* L. Ecotoxicology and Environmental Safety. 170, 68–76. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.11.127

Wojdylo, A., Oszmianski, J., Czemerys, R., 2007. Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. Food Chemistry. 105, 940-949. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.04.038

Wu, X., Ren, J., Huang, X., Zheng, X., Tian, Y., Shi, L., Li, Z., 2021. Melatonin: Biosynthesis, content, and function in horticultural plants and potential application. Scientia Horticulturae, 288, 110392. https://doi.org/10.1016/j.scienta.2021.110392

Xie, C., Pu, S., Xiong, X., Chen, S., Peng, L., Fu, J., Li, X., 2021. Melatonin-assisted phytoremediation of Pb-contaminated soil using bermudagrass. Environmental Science and Pollution Research. 28(32), 44374–44388. https://doi.org/10.1007/s11356-021-13790-0

Zayneb, C., Bassem, K., Zeineb, K., Grubb, CD., Noureddine, D., Hafedh, M., Amine, E., 2015. Physiological responses of fenugreek seedlings and plants treated with cadmium. Environmental Science and Pollution Research. 22, 10679-10689. https://doi.org/10.1007/s11356-015-4270-8

Zhang, X., Zhang, H., Zhang, H., Tang, M., 2020. Exogenous melatonin application enhances Rhizophagus irregularis symbiosis and induces the antioxidant response of *Medicago truncatula* under lead stress. Frontiers in Microbiology. 11, 516. https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00516

Zhang, J., Shi, Y., Zhang, X., Du, H., Xu, B., Huang, B., 2017. Melatonin suppression of heat-induced leaf senescence involves changes in abscisic acid and cytokinin biosynthesis and signaling pathways in perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.). Environmental and Experimental Botany. 138, 36–45. https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2017.02.012

Zhao, H., Guan, J., Liang, Q., Zhang, X., Hu, H., Zhang, J., 2021. Effects of cadmium stress on growth and physiological characteristics of sassafras seedlings. Scientific Reports, 10;11, 9913. https://doi.org/10.1038/s41598-021-89322-0