علوم باغبانی ایران
دورۀ ۴۷، شمارۀ ۱، بهار ۱۳۹۵ (ص ۳۱-۲۱)
DOI: 10.22059/ijhs.2016.58223

# تأثیر فلز کادمیم بر توانائی زیستی و فعالیت برخی آنزیم‌های پاداکسندگی در پینۀ گیاه پریوش (*Catharanthus roseus*)

**هاجر مرادی‌پور[1]، محمدحسین آبنوسی[2*]، محمدرضا امیرجانی[3] و مجید مهدیه[4]**
۱، ۲، ۳ و ٤. دانشجوی سابق کارشناسی ارشد و استادیاران، دانشکده علوم، دانشگاه اراک
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۸/۲۹- تاریخ تصویب: ۱۳۹۳/۷/۲٦)

## چکیده

**پریوش گیاهی زینتی و داروئی است که ازنظر اقتصادی نیز اهمیت دارد. از پینۀ (کالوس) گیاه پریوش دروایۀ (سوسپانسیون) یاخته‌ای تهیه و پس از تیمار با دزهای مختلف نیترات کادمیم به مدت ۱، ۳، ٦ روز توانائی زیست توسط تریپان بلو و MTT بررسی شد. سوسپانسیون یاخته‌ای برای بررسی ریخت‌شناسی (مورفولوژی) و بافت پینه برای بررسی فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، گایاکول پراکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز و پراکسیداسیون لیپیدی پس از تیمار با ۰، ۲۰، ۳۰ و ٤۰ میلی‌مولار به مدت سه روز استفاده شد. داده‌ها به روش ANOVA یک‌سویه و آزمون دانکن تجزیه (آنالیز) و P<۰/۰۵ به‌عنوان سطح معنی‌داری در نظر گرفته شد. داده‌های تریپان بلو و MTT نشان‌دهندۀ تفاوت معنی‌دار (p< ۰/۰۵) میانگین توانایی زیستی به‌صورت وابسته به دز در مقایسه با کنترل بود. همچنین فعالیت آنزیم‌های موردبررسی در پاسخ به تنش اکسایشی (اکسیداتیوی) ناشی از نیترات کادمیم افزایش معنی‌دار (p<۰/۰۵) نشان داد. میزان مالون دی آلدئید به‌عنوان محصول پراکسیداسیون لیپید نیز با افزایش معنی‌دار همراه بود. نیترات کادمیم باعث تخریب غشاء و کاهش توانائی زیستی یاخته‌ها شد، افزایش فعالیت آنزیم‌های پاداکسندگی قادر به جبران آسیب وارده نبود.**

**واژه‌های کلیدی:** آنزیم‌های پاداکسندگی، پاسخ یاخته‌ای، پینۀ گیاه پریوش، مالون دی آلدئید، نیترات کادمیم.

## مقدمه

فلزهای سنگین، فلزهایی با چگالی بیشتر از ۵ گرم بر سانتی‌مترمکعب تعریف می‌شوند، در این میان ۵۳ عنصر از ۹۰ عنصر موجود در طبیعت، فلزهای سنگین هستند (Aiman *et al*., 2009). در میان فلزهای سنگین برخی از آن‌ها اهمیت زیستی (بیولوژیک) دارند که از آن‌ها ۱۷ عنصر سنگین با توجه به حلالیتشان در بوم‌نظام (اکوسیستم) برای یاخته‌های زنده قابل‌دسترس بوده و اهمیت زیستی بالایی دارند (Nies, 1999). از بین این فلزها آهن، مولیبدن و منگنز به‌عنوان ریزمغذی برای گیاه مهم هستند (Michalak, 2006). از سوی دیگر روی، نیکل، مس، کبالت، وانادیم و کروم ازنظر سوخت‌وسازی (متابولیکی) عناصری بااهمیت زیستی متوسط هستند (Schutzendubel & Polle, 2001). ولی آرسنیک، جیوه، کادمیم، سرب و بیسموت، از دسته ریزمغزی‌های ضروری برای موجود زنده نبوده و برای گیاهان و ریزموجود (میکروارگانیسم)ها سمی هستند (Peralta-videa *et al*., 2009; Michalak, 2006,). بااین‌حال غلظت بالای همۀ فلزها منجر به مهار رشد و

* تلفن: ۰۸۶۳۲۲۱۱۴۵۴
E-mail: m-abnosi@araku.ac.ir

نشانه‌های سمیت می‌شود (Schutzendubel & Polle, 2001; Narula *et al*., 2005). غلظت بالای فلزهای سنگین باعث ایجاد تنش اکسایشی در گیاه شده که از تأثیر زیان‌بار این تنش در گیاهان تولید رادیکال‌های مختلف اکسیژن واکنش‌گر[1] است که به‌طورمعمول با ایجاد آسیب‌های غشایی، فرایندهای یاخته‌ای مختلفی مانند رشد، نورساخت (فتوسنتز) و غیره را دچار اختلال می‌کند (Sytar *et al*., 2013). انواع اکسیژن واکنش‌گر به‌طور طبیعی به میزان کم در کلروپلاست و میتوکندری یاخته‌های گیاهی به‌وسیلهٔ آنزیم‌هایی که در واکنش‌های احیاء به‌ویژه فرایند انتقال الکترون و تنفس شرکت می‌کنند، تولید می‌شود (DIÁZ *et al*., 2001). ولی این میزان توسط آنزیم‌های جاروب‌گر[2] مانند سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز و پراکسیداز از بین رفته و هیچ‌گونه خطری برای یاخته ایجاد نمی‌کنند. عناصر سنگین (مانند کادمیم)که الکترون‌های غیرجفت‌شده در مدار (اوربیتال)های خود دارند، دهنده و گیرندهٔ خوب الکترون‌های منفرد هستند، بنابراین احتمال انتقال تک الکترون به اکسیژن را افزایش داده و به‌طورکلی تولید انواع اکسیژن واکنش‌گر و بروز اکسایش (اکسیداسیون) را افزایش می‌دهند (Michalak, 2006). این عناصر مسیرهای سوخت‌وسازی را به‌ویژه در غشاء تیلاکوئیدی مختل کرده و منجر به افزایش تولید رادیکال‌های آزاد و انواع اکسیژن واکنش‌گر می‌شوند (Sytar *et al*., 2013). یاخته‌های گیاهی تلاش می‌کنند تا غلظت‌های انواع اکسیژن واکنش‌گر را در کمترین میزان ممکن نگه دارند، زیرا آنها بسیار واکنش‌پذیرتر از اکسیژن مولکولی بوده و با بیشتر ترکیب‌های آلی یاختهٔ زنده مانند پروتئین‌ها، لیپیدها و اسیدهای نوکلئیک واکنش داده و به یاخته آسیب می‌رسانند (Sahw *et al*., 2004). در وضعیت پایدار، مولکول‌های اکسیژن واکنش‌گر (ROS) توسط سازوکارهای دفاعی پاداکسندگی گیاه، زدوده می‌شوند (Foyer & Noctor, 2003). ولی تعادل بین تولید و پالایش ROS ممکن است به‌وسیلهٔ تنش‌های زیستی و غیرزیستی متفاوتی مانند فلزهای سنگین بر هم بخورد. به هم خوردن تعادل منجر به افزایش ناگهانی سطح درون‌یاخته‌ای ROS شده که می‌تواند عامل اصلی آسیب به ساختار یاخته‌ای و تولید مالون دی آلدئید درنتیجه اکسایش لیپیدهای غشائی باشد (Sytar *et al*., 2013). گیاه پریوش یک گیاه دارویی مهم با ۱۳۰ نوع آلکالوئید و همچنین ترکیبات فنلی است (Kokate & Purohit, 2007)، این گیاه فعالیت ضد میکروبی، ضد قارچی، ضد دیابت، ضد سرطان و ضدویروس دارد (Farahani *et al*., 2011). در این گیاه نیز همانند گیاهان دیگر پاسخ یاخته‌ای در صورت رویارویی با تنش اکسایشی برای کاهش یا حذف رادیکال‌های آزاد اعمال می‌گردد. لذا در این تحقیق توانایی زیستی و میزان پر اکسیداسیون لیپیدها ازیک‌سو و فعالیت آنزیم‌های پاداکسندگی به‌عنوان پاسخ یاخته‌ای برای رفع تنش در پینهٔ این گیاه تیمارشده با فلز سنگین کادمیم از سوی دیگر بررسی و ارزیابی شد.

## مواد و روش‌ها

### تهیهٔ مواد گیاهی و محیط کشت

بذر رقم صورتی پریوش (*Catharanthus roseus*) از شرکت پاکان بذر اصفهان تهیه شد. بذرهای سترون (استریل)شده به مدت ۲۴ ساعت در آب مقطر خیسانده و سپس در گلدان‌های حاوی پرلیت بافاصلهٔ مناسب کاشته شدند. گلدان‌ها با محلول هوگلند ۱/۲ آبیاری و در اتاق کشت با دورهٔ نوری ۱۶ ساعت روشنایی با شدت نور ۱۶۰۰۰ لوکس و ۸ ساعت تاریکی نگهداری شدند. دمای محیط در روز ۲±۲۸ درجهٔ سلسیوس و در شب ۲±۲۵ درجهٔ سلسیوس و رطوبت محیط بین ۳۰ تا ۴۰ درصد حفظ شد. پس از شش هفته برگ‌ها از قسمت انتهایی گیاه، به‌عنوان ریزنمونه جدا و برای ضدعفونی سطحی، در زیر هود درون محلول هیپوکلرید سدیم ۵ درصد به مدت ۱۵ دقیقه قرار گرفتند، سپس چندین مرتبه با آب مقطر اتوکلاوشده شستشو و به مدت ۱۰ دقیقه در اتانول ۷۰ درصد نیز قرار گرفتند. باردیگر قطعه‌ها چندین مرتبه با آب اتوکلاوشده شستشو و سپس قطعه‌ها به طول

1. Reactive oxygen species
2. Scavenger enzymes

۱-۰/۵ سانتی‌متر روی محیط کشت MS[1] حاوی ساکارز با غلظت ۳۰ گرم در لیتر به‌عنوان منبع کربن، ویتامین‌ها شامل، تیامین (با غلظت ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر) ، پیرودوکسین (با غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر)، نیکوتین (با غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر)، عناصر پرمصرف یا اصلی (ماکرو) و کم مصرف یا ریزمغذی‌ها (میکرو) و ترکیب هورمونی کاینتین (با غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر) و ۲ و۴ دی کلروفنوکسی استیک اسید (2,4-D) (با غلظت ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر) قرار گرفتند. این قطعه‌ها درنهایت در اتاق کشت با دمای ۲۵-۲۷ درجهٔ سلسیوس نگهداری شدند تا پینه تولید شد، از پینه پس از واکشت سوم برای تیماردهی استفاده شد که مدت‌زمان هر واکشت نیز سه هفته بود.

**کشت درواية یاخته‌ای**

پینه در محیط کشت مایع MS بدون آگار قرارگرفته و روی دستگاه لرزا (شیکر) با دور ۱۰۰ rpm در ۲۵ درجهٔ سلسیوس در تاریکی نگهداری (انکوبه) شد. نمونه‌ها به‌طورمرتب به‌صورت روزانه با میکروسکوپ بررسی شدند تا از تشکیل یاخته اطمینان حاصل شود. یاخته‌ها هر هفته یک‌بار با محیط کشت تازه به‌صورت ۱:۱ رقیق و واکشت شدند، درنهایت یاخته‌های افزونش‌شده برای بررسی توان‌زیستی و زیست‌شناسی پس از واکشت سوم استفاده شدند ( Saifullah & Saifullah khan, 2012).

**بررسی توان‌زیستی یاخته‌ها (یافتن دز مؤثر) به کمک آزمون تریپان بلو و روش رنگ‌سنجی[2]**

۱) برای این منظور ۸۰۰۰۰ یاخته، در هر سینی (پلیت) ۲۴ خانه اضافه شد. محیط درواية حاوی نیترات کادمیم در غلظت‌های ۰، ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰، ۵۰، ۶۰ میلی‌مول با سه تکرار به ترتیب به هر خانهٔ سینی ۲۴ خانه اضافه و سینی‌ها به محفظهٔ رشد (انکوباتور) لرزادار منتقل شد. پس از سپری شدن ۱،۳، ۶ روز محلول رویی هر خانه خارج و به نسبت ۱:۱ تریپان بلو ۰/۴ درصد به هر خانه اضافه و سینی به مدت ۲ دقیقه در اتاقک رشد ۳۷ درجهٔ سلسیوس انکوبه شد. سپس با استفاده از لام نئوبار یاخته‌های آبی (رنگ یاخته‌های مرده) و یاخته‌های بی‌رنگ (یاخته‌های زنده) شمارش شد. با استفاده از فرمول زیر، درصد زنده بودن یاخته‌ها در مورد هر غلظت در زمان‌های ۱، ۳، ۶ روز محاسبه شد.

$$\text{درصد توانایی زیستی} = \frac{\text{تعداد سلول‌های زنده}}{\text{تعداد کل سلول‌ها}} \times ۱۰۰$$

۲) شمار ۸۰۰۰۰ یاخته به هر سینی ۲۴ خانه اضافه و محیط درواية حاوی نیترات کادمیم در غلظت‌های ۰، ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰، ۵۰، ۶۰ میلی‌مول با سه تکرار به ترتیب به هر خانهٔ سینی ۲۴ خانه اضافه شد. پس از سپری شدن ۱، ۳، ۶ روز چاهک‌ها با بافر فسفات نمکی شستشو و به هر چاهک ۵۰۰ میکرولیتر بافر فسفات نمکی و ۵۰ میکرولیتر محلول MTT[3] اضافه و به مدت ۴ ساعت در اتاقک رشد ۳۷ درجهٔ سلسیوس انکوبه شد. پس از سپری شدن این مدت محیط رویی هر چاهک تخلیه و به‌منظور حل شدن بلورهای فورمازان ۱۰۰ میکرولیتر دی‌متیل سولفواکسید[4] به آن‌ها اضافه و به مدت نیم ساعت در دمای اتاق و تاریکی قرار داده شد. سپس محتوای هر چاهک از سینی ۲۴ خانه به لوله‌های اپن دورف منتقل و در دور ۱۰۰۰۰ سانتریفوژ شد. نمونه‌ها به چاهک‌های مشخص از یک سینی ۹۶ چاهکی منتقل و جذب آن‌ها در طول‌موج ۵۰۵ نانومتر با استفاده از ELISA-reader (شرکت SCO GmbH کشور آلمان) خوانده شد. داده‌ها به‌صورت درصد توانائی زیستی یاخته‌های تیمارشده نسبت به کنترل بیان شد.

**بررسی تغییرپذیری‌های ریخت‌شناختی**

برای بررسی تغییرپذیری‌های ریخت‌شناختی هسته و سیتوپلاسمی به ترتیب از رنگ‌های فلورسنت هوخست (۱mg/ml) و آکریدین اورنژ (۱mg/ml) استفاده شد. درواية یاخته‌ای حاوی نیترات کادمیم با غلظت‌های ۰،

1. Murashige and Skoog
2. MTT
3. 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
4. DMSO (dimethyl sulfoxide)

۲۰، ۳۰، ۴۰ میلی‌مول بر میلی‌لیتر و با سه تکرار به ترتیب به هر خانهٔ سینی ۲۴ خانه اضافه شد. پس از سپری شدن سه روز، محیط رویی در خانه‌های سینی ۲۴ خانه تخلیه و یاخته‌ها توسط بافر نمکی فسفات[1] شسته شد. سپس ۵۰۰ میکرولیتر بافر فسفات و ۱۰ میکرولیتر محلول هوخست به چاهک‌های پلیت ۲۴ خانه اضافه و به مدت ۳ دقیقه انکوبه شد. یاخته‌ها بار دیگر با بافر PBS شسته و برای بررسی تغییرپذیری‌های ریخت‌شناختی و یا ساختار ظاهری هسته، نمونه‌ها توسط میکروسکوپ فلورسنس المپوس (PX41) مجهز به دوربین (DP71) بررسی و عکس‌برداری شد. برای بررسی ساختارظاهری سیتوپلاسم، رنگ‌آمیزی یاخته‌ها برابر مراحل یادشده با محلول آکریدین اورانژ به مدت ۲ دقیقه انجام و توسط میکروسکوپ فلورسنس بررسی و عکس‌برداری شد.

**استخراج عصارهٔ آنزیمی**

میزان ۰/۵ گرم از بافت پینه با استفاده از نیتروژن مایع سائیده و توسط ۱ میلی‌لیتر بافر فسفات پتاسیم ۱۰۰میلی‌مولار (pH=۷) استخراج شد. ترکیب حاصل در دمای ۴ درجهٔ سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۱۲۰۰۰rpm سانتیریفوژ شد و از محلول شفاف رویی که حاوی عصارهٔ آنزیمی بود برای تعیین میزان فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز[2]، سوپراکسیددیسموتاز[3]، کاتالاز[4] استفاده شد. میزان پروتئین کل نمونه‌ها توسط روش لاوری تعیین و پس از رسم منحنی استاندارد با استفاده از BSA توسط فرمول خطی y=۰/۸۸۵x+۰/۰۸۴ و $R^2$=۰/۹۹۶ محاسبه شد.

**بررسی فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز، کاتالاز و سوپر اکسید دسموتاز**

فعالیت آنزیم POX با استفاده از گایاکول به‌عنوان کروموژن اندازه‌گیری شد. در این روش ۳ میلی‌لیتر محلول بافر فسفات پتاسیم ۱۰۰ میلی‌مولار (pH=۷)، ۵۰ میکرولیتر گایاکول ۲۰ میلی‌مولار، ۵۰ میکرولیتر $H_2O_2$ ۳۷ درصد و ۵۰ میکرولیتر عصارهٔ آنزیمی به‌عنوان مخلوط واکنش تهیه شد. افزایش جذب به دلیل اکسایش گایاکول در طول‌موج ۴۷۰ نانومتر به مدت ۳ دقیقه با روش طیف‌سنج نوری (اسپکتروفتومتر، مدل T80+ شرکت PG کشور انگلستان) اندازه‌گیری و درنهایت فعالیت آنزیم پراکسیداز با استفاده از ضریب خاموشی معادل ۲۶/۶ $mmol^{-1}cm^{-1}$ محاسبه و برحسب یک واحد (میکرومول تتراگایاکول تولیدشده در دقیقه) بر میلی‌گرم پروتئین بیان شد (Polle *et al*., 1994).

فعالیت آنزیم CAT با روش طیف‌سنج نوری و بر پایهٔ کاهش جذب $H_2O_2$ به مدت ۵ دقیقه در طول‌موج ۲۴۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. مخلوط واکنش شامل ۲ میلی‌لیتر بافر فسفات ۲۵ میلی‌مولار (pH=۷)، ۱۰۰ میکرولیتر $H_2O_2$، ۳۷ درصد و ۵۰ میکرولیتر عصارهٔ آنزیمی بود. میزان فعالیت آنزیم با طیف‌سنج نوری (مدل T80+ شرکت PG کشور انگلستان) قرائت با استفاده از ضریب خاموشی معادل ۳۶ $mmol^{-1}cm^{-1}$ محاسبه و برحسب یک واحد (میکرومول پراکسید هیدروژن مصرف‌شده در دقیقه) بر میلی‌گرم پروتئین بیان شد (Cakmak & Marschner, 1992).

برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم SOD به ۲ میلی‌لیتر بافر فسفات پتاسیم ۵۰ میلی‌مولار (pH=۷) که حاوی ۱۹ میلی‌گرم متیونین، ۶۱ میلی‌گرم نیتروبلوتترازولیوم، ۷۹ میلی‌گرم ریبوفلاوین و ۳/۳ میلی‌گرم EDTA بود ۵۰ میکرولیتر عصارهٔ آنزیمی اضافه شد. واکنش با قرار دادن نمونه‌ها در مقابل نور (LUX ۵۰۰۰) آغاز و پس از ۱۰ دقیقه بی‌درنگ جذب نمونه‌ها در ۵۶۰ نانومتر با طیف‌سنج نوری (مدل T80+ شرکت PG کشور انگلستان) خوانده شد. یک واحد فعالیت آنزیمی معادل میزانی از آنزیم است که موجب ۵۰ درصد بازدارندگی احیای نیتروبلو تترازولیوم[5] در ۵۶۰ نانومتر می‌شود. میزان فعالیت آنزیم برحسب یک واحد در دقیقه به ازای میلی‌گرم پروتئین محاسبه شد (Giannopolitis & Rise,1977).

1. PBS (phosphate buffer saline)
2. POX (peroxidase)
3. SOD (superoxide dismutase)
4. CAT (catalase)
5. NBT (nitroblue tetrazolium)

**سنجش میزان پراکسیداسیون لیپیدها**

برای اندازه‌گیری میزان پراکسیداسیون لیپید از روش Zaho با اندکی تغییر استفاده شد. بدین منظور ۰/۵ گرم از بافت با ۴ میلی‌لیتر از محلول تری کلرواستیک اسید ۰/۱ درصد در هاون چینی سائیده و عصاره در دور ۴۰۰۰rpm به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفوژ شد. سپس ۲ میلی‌لیتر از محلول رویی و ۲ میلی‌لیتر از محلول تری‌کلرواستیک اسید ۱۰ درصد حاوی ۰/۵ درصد تیوباربیوتیک اسید را در حمام آب گرم در دمای ۱۰۰ درجهٔ سلسیوس به مدت ۳۰ دقیقه قرار داده و به مدت ۱۵ دقیقه در یخ قرار گرفت تا سرد شود. جذب محلول در طول‌موج ۶۰۰ نانومتر خوانده شد و از جذب خوانده‌شده در طول‌موج ۵۳۲ نانومتر کم شد. از تری کلرواستیک اسید ۱۰ درصد حاوی ۰/۵ درصد تیوباربیوتیک اسید برای صفر کردن دستگاه استفاده شد. غلظت کمپلکس تیوباربیتوریک- مالون‌دی‌آلدئید با استفاده از ضریب خاموشی $\varepsilon$=۱۵۵ $mmol^{-1}\ cm^{-1}$ محاسبه و به‌صورت میکرومول بر گرم وزن خشک بافت پینه گزارش شد (Metwally *et al*., 2003).

**تجزیه‌وتحلیل آماری**

تجزیه‌وتحلیل آماری همهٔ داده‌های با استفاده از نرم‌افزار SPSS-16 و ANOVA یک‌سویه انجام پذیرفت. میانگین شاخص‌های اندازه‌گیری‌شده با استفاده از آزمون دانکن گروه‌بندی و $p<۰/۰۵$ به‌عنوان سطح معنی‌دار در نظر گرفته شد.

## نتایج و بحث

**تأثیر نیترات کادمیم بر توانایی حیات یاخته‌ها**

همان‌طور که در جدول‌های ۱ و ۲ آمده است، روش‌های رنگ‌آمیزی تریپان بلو و رنگ‌سنجی MTT نشان دادند که تیمار یاخته‌های حاصل از پینهٔ گیاه پریوش در زمان‌های ۱، ۳، ۶ روزه با غلظت‌های ۱۰ تا ۶۰ میلی‌مولار نیترات کادمیم موجب کاهش معنی‌دار ($p<۰/۰۵$) و وابسته به دز یا میزان توانایی زیستی در مقایسه با شاهد شد. هم‌چنین تجزیهٔ داده‌ها به‌روش دوسویه (Two way ANOVA, $p<۰/۰۵$) نشان داد که دزهای متفاوت و زمان‌های مختلف با نیترات کادمیم بر توانایی زیستی یاخته‌های پینهٔ گیاه پریوش اثر متقابل داشت (جدول نشان داده نشد). این درحالی است که در نتایج رنگ‌آمیزی با تریپان بلو در گروه‌های تیمارشده در روز اول LD50 درحدود غلظت ۴۰ میلی‌مولار مشاهده شد، درصورتی‌که در روز سوم نیز LD50 درحدود غلظت ۴۰ میلی‌مولار و در روز ششم LD50 در غلظت ۳۰ میلی‌مولار مشاهده شد، از سویی میزان LD75 برای روزهای ۱، ۳ و ۶ درحدود به ترتیب در غلظت‌های ۶۰، ۵۰ و ۴۰ قابل‌مشاهده بود (جدول ۱). لازم به یادآوری است که روند نتایج ناشی از روش رنگ‌سنجی MTT نیز نتایج ناشی از روش رنگ‌آمیزی تریپان بلو را تأیید کرد (جدول ۲). در این پژوهش بررسی توانایی زیستی یاخته‌های پینهٔ گیاه پریوش به کمک دو آزمون رنگ‌آمیزی تریپان بلو و آزمون MTT نشان داد که غلظت ۱۰ میلی‌مولار نیترات کادمیم سبب کاهش معنی‌دار توانایی زیست یاخته‌های پینه در هر سه زمان شد و با افزایش غلظت نیترات کادمیم روند توانایی زیست یاخته‌ها به‌طور چشمگیری کاهش یافت که این کاهش وابسته به دز و زمان بود. در تحقیق گزارش‌شده توسط Wajda *et al*. (1989) نشان داده شد که با افزایش غلظت کلرید کادمیم (۰ تا ۴۴/۹۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر) و افزایش زمان (۱تا ۲۷ روز) توانایی زیست پینهٔ گیاه پریوش وابسته به دز و زمان کاهش معنی‌دار یافته است. نتایج این تحقیق نیز برابر با این گزارش مبنی بر وابسته بودن توانایی زیست یاخته‌های پینهٔ گیاه پریوش به دز و زمان تیمار با نیترات کادمیم بود.

**انتخاب دز برای ادامهٔ بررسی**

با توجه به نتایج به‌دست‌آمده از آزمون رنگ‌آمیزی تریپان بلو و رنگ‌سنجی MTT مشخص شد که همهٔ دزها نسبت به یکدیگر تفاوت معنی‌داری را نشان دادند. ازآنجاکه در دزهای نزدیک به یکدیگر نیز مرگ‌ومیر به‌صورت وابسته به دز مشاهده شد و از سویی با توجه به اینکه دز ۴۰ در مدت‌زمان سه روز درحدود باعث مرگ ۵۰ درصد از یاخته‌ها شده بود، لذا برای ادامه بررسی افزون بر این دز دو دز ۲۰ و ۳۰ میلی‌مولار نیز در همان پس زمانی انتخاب شد.

جدول ۱. مقایسهٔ درصد میانگین توانایی زیستی یاخته‌ها پس از تیمار با دزهای مختلف نیترات کادمیم در زمان‌های ۱، ۳ و ۶ روز توسط روش رنگ‌آمیزی تریپان بلو

Table 1. Comparison of the mean percentage of cell viability after 1, 3 and 6 days of treatment with different levels of cadmium nitratee using trypan blue staining

| Levels (mM) \ Days | 1 | 3 | 6 |
|---|---|---|---|
| 0 | $91.10^{a}\pm0.96$ | $89.77^{a}\pm0.39$ | $91.06^{a}\pm1/02$ |
| 10 | $81.80^{b}\pm0.77$ | $79.93^{b}\pm0.85$ | $74.01^{b}\pm1.51$ |
| 20 | $75.70^{c}\pm0.15$ | $66.17^{c}\pm0.89$ | $59.87^{c}\pm0.17$ |
| 30 | $69.83^{d}\pm0.44$ | $52.54^{d}\pm0.67$ | $45.37^{d}\pm0.24$ |
| 40 | $40.07^{e}\pm0.20$ | $42.77^{e}\pm0.57$ | $20.07^{e}\pm0.50$ |
| 50 | $32.48^{f}\pm1.05$ | $32.59^{f}\pm0.22$ | $11.85^{f}\pm0.02$ |
| 60 | $21.02^{g}\pm0.07$ | $15.75^{g}\pm0.64$ | $4.67^{g}\pm0.69$ |

مقادیر به‌صورت means±SD است. میانگین‌ها با کد حرف‌های متفاوت در یک ستون تفاوت معنی‌دار دارد. (one way ANOVA, Duncan test, p<0.05).

Values are means±SD. Means with different letter code in a column differe significantly. (one way ANOVA, Duncan test, p<0.05).

جدول ۲. مقایسهٔ درصد میانگین توانایی زیستی یاخته‌ها پس از تیمار با دزهای مختلف نیترات کادمیم در زمان‌های ۱، ۳ و ۶ روز با روش MTT

Table 2. Comparison of the mean percentage of cell viability after 1, 3 and 6 days of treatment with different levels of cadmium nitratee using MTT assay

| Levels (mM) \ Days | 1 | 3 | 6 |
|---|---|---|---|
| 0 | $91.73^{a}\pm0.59$ | $90.77^{a}\pm0.28$ | $93.1^{a}\pm0.61$ |
| 10 | $74.50^{b}\pm0.76$ | $59.81^{b}\pm0.23$ | $55.04^{b}\pm0.21$ |
| 20 | $63.18^{c}\pm0.36$ | $54.31^{c}\pm0.14$ | $44.99^{c}\pm0.12$ |
| 30 | $54.02^{d}\pm0.37$ | $45.50^{d}\pm0.15$ | $29.47^{d}\pm0.18$ |
| 40 | $49.37^{e}\pm0.13$ | $35.87^{e}\pm0.44$ | $19.66^{e}\pm0.14$ |
| 50 | $33.25^{f}\pm0.19$ | $18.39^{e}\pm0.15$ | $9.33^{f}\pm0.12$ |
| 60 | $22.21^{g}\pm0.50$ | $14.26^{g}\pm0.44$ | $3.50^{g}\pm0.20$ |

مقادیر به‌صورت means±SD است. میانگین‌ها با کد حرف‌های متفاوت در یک ستون تفاوت معنی‌دار دارد. (one way ANOVA, Duncan test, p<0.05).

Values are means±SD. Means with different letter code in a column differe significantly. (one way ANOVA, Duncan test, p<0.05).

**تأثیر نیترات کادمیم بر ساختار ظاهری یاخته‌های تیمارشده**

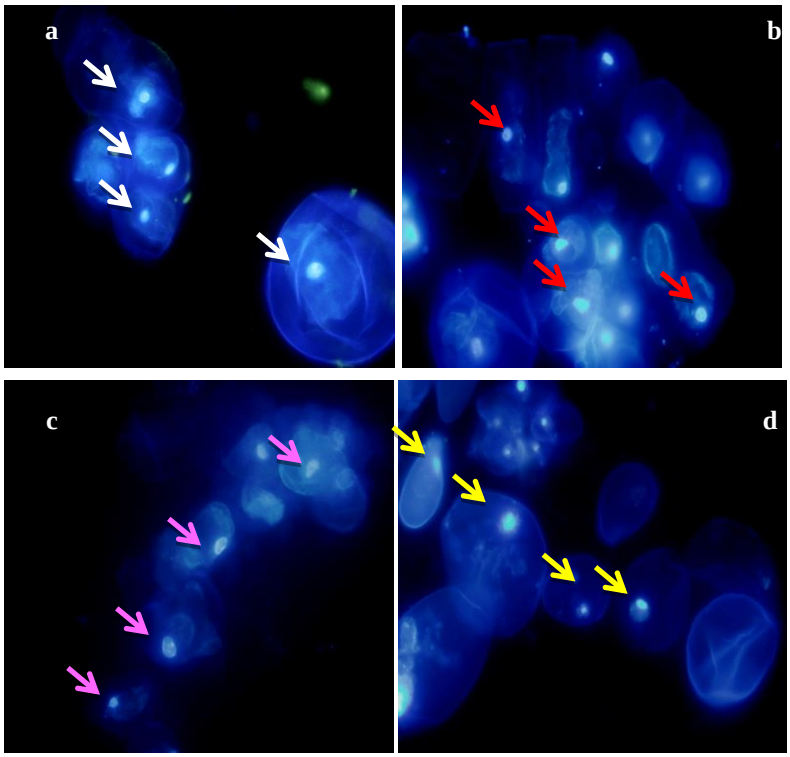
یاخته‌های تیمارشده با رنگ‌آمیزی فلورسنت هوخست در مقایسه با گروه شاهد نشان داد که هستهٔ یاخته‌ها دچار تغییرپذیری‌های ساختارظاهری، مانند فشردگی کروماتین، کوچک شدن هسته و تغییر مکان آن نسبت به کنترل شد. این تغییرپذیری‌های در غلظت‌های بالاتر (۴۰ میلی‌مولار) چشمگیرتر بود (شکل ۱) که منجر به خرد شدن و از بین رفتن هسته شد. یاخته‌های تیمارشده با نیترات کادمیم با دز ۲۰، ۳۰ و ۴۰ میلی‌مولار ازنظر سیتوپلاسمی نیز دچار تغییرپذیری‌های ساختارظاهری بارزی مانند چروکیدگی و تغییر در حاشیهٔ سیتوپلاسم یاختهٔ تیمارشده نسبت به گروه کنترل شد (شکل۲). لازم به یادآوری است که حاشیهٔ سیتوپلاسمی در یاخته‌های گروه کنترل بسیار صاف و یکدست بود درصورتی‌که این حاشیه‌ها در یاخته‌های تیمارشده با ایجاد زائده و ازهم‌پاشیدگی سیتوپلاسمی همراه بود. مرگ یاخته‌ای با تنش فلزهای سنگین مانند یون‌های کادمیم القا می‌شود که در گیاهان به‌عنوان مرگ برنامه‌ریزی‌شده[1] و نکروزیس طبقه‌بندی می‌شود. PCD به‌عنوان الگوی فعال مرگ یاخته‌ای است که با ژن‌ها کنترل‌شده و مشخصهٔ آن در گیاهان شامل، چروکیدگی یاخته، متراکم شدن کروماتین، شکست رشته‌ای DNA و قطعه‌قطعه شدن DNA است (McCabe & Leaver, 2000; Van Doorm & Woltering, 2005). در سال‌های اخیر در پژوهشی نشان داده شد که یاخته‌های برخی گونه‌های گیاهی که در معرض کادمیم قرار گرفتند دچار PCD شدند (Fojtova *et al.*, 2002). در این پژوهش تیمار با نیترات کادمیم باعث کاهش معنی‌دار توانایی زیستی یاختهٔ پینهٔ گیاه پریوش و تغییر در ساختارظاهری یاخته

1. PCD (programmed cell death)

شامل کوچک شدن هسته، تراکم کروماتین و چروکیدگی سیتوپلاسم شد، این نتایج در راستای نتایج دیگران به‌احتمال می‌تواند نشان‌دهنده PCD باشند.

**تأثیر نیترات کادمیم بر میزان مالون دی آلدئید**

تجزیهٔ آماری داده‌ها نشان داد که تیمار پینهٔ گیاه پریوش با دزهای ۳۰ و ۴۰ میلی‌مولار نیترات کادمیم به مدت سه روز باعث افزایش معنی‌دار (p<۰/۰۵) میزان مالون دی آلدئید نسبت به کنترل و تیمار ۲۰ میلی‌مولار شد. این در حالی است که تیمار با دز ۲۰ میلی‌مولار هیچ تغییر معنی‌داری را نسبت به شاهد نشان نداد (P>۰/۰۵) (جدول ۳). به‌طورعموم برای ارزیابی آسیب به غشاهای زیستی و پراکسیداسیون لیپیدی از نشانگر (مارکر) زیستی مالون‌دی‌آلدئید استفاده می‌شود (Lin & Kao, 2000). از سویی نیز در سطح یاخته‌ای، کادمیم منجر به القاء تغییر در ترکیبات لیپیدی و فعالیت آنزیم‌های مرتبط با غشاء در گیاهان می‌شود (Foyer & Noctor, 2003). بدین ترتیب انتظار می‌رود که با افزایش غلظت نیترات کادمیم میزان مالون دی آلدئید نیز افزایش داشته باشد. در این پژوهش با افزایش نیترات کادمیم میزان مالون دی آلدئید نیز افزایش معنی‌داری نشان داد، افزایش تجمع مالون دی آلدئید در تیمار با نیترات کادمیم نشان‌دهندهٔ افزایش پراکسیداسیون لیپید و تخریب بیشتر غشاء است. Zhao *et al.* (2011) روی گیاه گندم و ذرت نشان دادند که ۰/۰۱ ، ۰/۱ و ۱ میلی‌گرم بر لیتر کادمیم منجر به افزایش میزان مالون دی آلدئید وابسته به دز شد.




شکل ۱. رنگ‌آمیزی یاخته‌های پینهٔ گیاه پریوش بارنگ فلورسنت هوخست پس از سه روز تنش. (a) یاخته‌های گروه کنترل پیکان‌ها، هستهٔ یاختهٔ عادی را نشان می‌دهد. (b) یاخته‌های تیمارشده با ۲۰ میلی‌مولار نیترات کادمیم ، پیکان‌ها تغییر مکان و متراکم شدن هسته را نشان می‌دهد. (c) یاخته‌های تیمارشده با ۳۰ میلی‌مولار نیترات کادمیم ، پیکان‌ها قطعه‌قطعه شدن هسته و مهاجرت آنها به‌طرف غشاء سیتوپلاسمی را نشان می‌دهد. (d) یاخته‌های تیمارشده با ۴۰ میلی‌مولار نیترات کادمیم ، پیکان‌ها خروج هسته از یاخته را نشان می‌دهد (بزرگ‌نمایی ۴۰x)

Figure 1. Staining of *C. roseus* callus cells with Hochest flouresent dye after 3 days of stress. (a) cells of the control group, the arrows show the nuclei in the normal cells. (b) cells treated with 20 mM of cadmium nitrate, arrows show the dislocalization and condensation of the nuclei. (c) cells treated with 30 mM of cadmium nitrate, arrows show nuclear breakage and nuclear migration towards the cytoplasm membrane. (d) cells treated with 40 mM of cadmium nitrate, arrows show the nuclei is discharged from cytoplasm (magnification 40x)

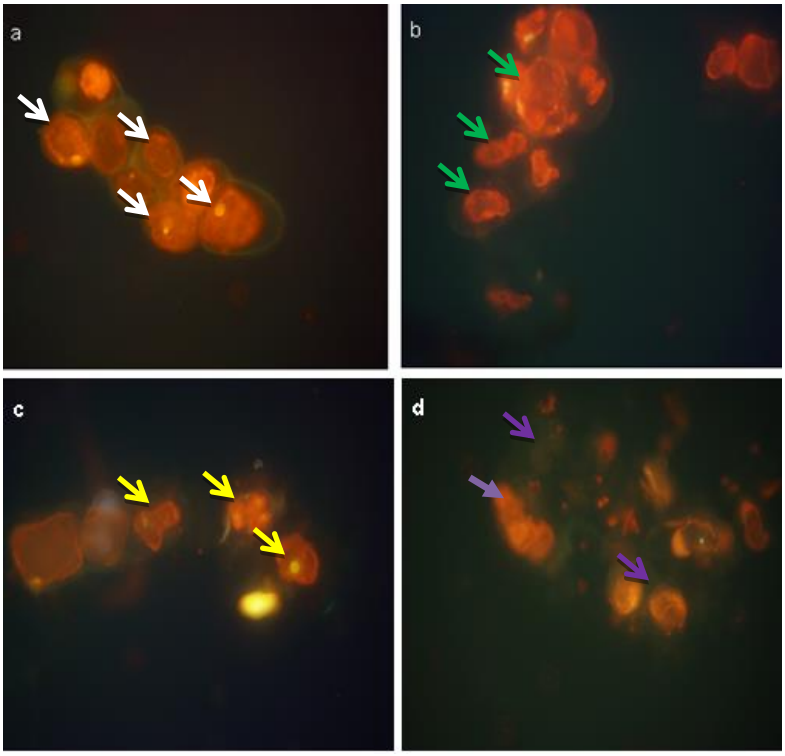
جدول ۳. مقایسهٔ میانگین محتوای مالون دی آلدئید ($\mu M^{-1}FW$) و فعالیت آنزیم‌های سوپراکسیددیسموتاز($unit\ min^{-1}mg^{-1}protein$)، پراکسیداز ($unit\ min^{-1}\ mg^{-1}protein$) و کاتالاز ($unit\ min^{-1}mg^{-1}protein$) پینهٔ گیاه پریوش سه روز پس از تیمار با نیترات کادمیم (۲۰، ۳۰ و ۴۰ میلی‌مولار)

Table 3. Mean comparison of malondialdehyde ($\mu M^{-1}FW$) and activity of enzymes superoxide dismutase ($unit\ min^{-1}mg^{-1}protein$), peroxidase ($unit\ min^{-1}mg^{-1}protein$), catalase ($unit\ min^{-1}mg^{-1}protein$) in the *C. roseous* callus after 3 days of treatment with cadmium nitrate (20, 30 and 40 mM)

| Levels (mM) of cadmium nitratee | catalase ($unit\ min^{-1}\ mg^{-1}$ protein) | peroxidase ($unit\ min^{-1}\ mg^{-1}$ protein) | Superoxide dismutase ($unit\ mg^{-1}protein$) | malondialdehyde ($\mu mol\ g^{-1}$ FW) |
|---|---|---|---|---|
| 0 | $0.78^{a}\pm0.03$ | $0.46^{a}\pm0.04$ | $20.17^{a}\pm0.07$ | $0.11^{a}\pm0.01$ |
| 20 | $0.84^{ab}\pm0.05$ | $0.84^{a}\pm0.07$ | $21.75^{a}\pm0.10$ | $0.10^{a}\pm0.01$ |
| 30 | $1.45^{c}\pm0.11$ | $1.27^{b}\pm0.15$ | $29.22^{b}\pm0.03$ | $0.20^{b}\pm0.00$ |
| 40 | $2.06^{d}\pm0.09$ | $2.37^{c}\pm0.55$ | $34.70^{c}\pm0.00$ | $0.31^{c}\pm0.02$ |

مقادیر به‌صورت means ±SD است. میانگین‌ها با کد حرف‌های متفاوت در یک ستون تفاوت معنی‌دار دارند(one way ANOVA, Duncan test, $p<0.05$)

Values are means±SD. Means with different letter code in a column differe significantly. (one way ANOVA, Duncan test, $p<0.05$).




شکل۲. رنگ‌آمیزی یاخته‌های پینهٔ گیاه پریوش بارنگ فلورسنت آکریدین اورنژ پس از سه روز تنش. (a) یاخته‌های گروه کنترل، حاشیهٔ سیتوپلاسم صاف و یکنواخت است (b) یاخته‌های تیمارشده با ۲۰ میلی‌مولار نیترات کادمیم، پیکان‌ها چروکیدگی سیتوپلاسم را نشان می‌دهد. (c) یاخته‌های تیمارشده با ۳۰ میلی‌مولار نیترات کادمیم، پیکان‌ها پارگی سیتوپلاسم را نشان می‌دهد. (d) یاخته‌های تیمارشده با ۴۰ میلی‌مولار نیترات کادمیم، پیکان‌ها جسم یاخته‌ای بدون هسته را نشان می‌دهد (بزرگ‌نمایی ۲۰x)

Figure 2. Staining of *C. roseus* callus cells with acridine orange flouresent dye after 3 days of stress. (a) cells of the control group, the cytoplasm margin is smooth and continous. (b) cells treated with 20 mM of cadmium nitrate, arrows show cytoplasm shtrinkage. (c) cells treated with 30 mM of cadmium nitrate, arrows show cytoplasm breakage. (d) cells treated with 40 mM of cadmium nitrate, arrows show the cell body with out nuclei (magnification 20x)

**تأثیر نیترات کادمیم بر فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز و پراکسیداز**

تجزیهٔ آماری داده‌های به‌دست‌آمده از اندازه‌گیری فعالیت آنزیم SOD پینهٔ گیاه پریوش تیمارشده با دزهای ۳۰ و۴۰ میلی‌مولار نیترات کادمیم موجب افزایش معنی‌دار فعالیت این آنزیم نسبت به شاهد شد (P<۰/۰۵). این در حالی است که دز ۲۰ میلی‌مولار هیچ‌گونه تغییر معنی‌داری نسبت به شاهد نشان نداد

(p>۰/۰۵) (جدول ۳). از سوی دیگر در این پژوهش فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز SOD که مسئول اصلی حذف رادیکال‌های سوپراکسید در یاخته‌ها است با افزایش غلظت نیترات کادمیم افزایش پیدا کرد. تنش‌های مختلف محیطی منجر به افزایش تولید ROS می‌شوند و SOD در افزایش تحمل گیاهان نسبت به این تنش‌ها و فراهم کردن نخستین سازوکارهای مقاومت به اثرگذاری‌های سمی سطوح بالای ROS بااهمیت بوده و نقش ویژه‌ای دارد (Gill & Tuteja, 2010). این آنزیم تبدیل سوپراکسید به هیدروژن پراکسید و اکسیژن را کاتالیز می‌کند (Gill & Tuteja, 2010). Israr *et al.* (2005) در تحقیقات خود روی پینهٔ گیاه *Sebania drummondii* نشان دادند که تیمار ۵۰ میکرومولار کلرید کادمیم، منجر به نتیجه‌ای همانند این نتایج می‌شود. لذا آنان نشان دادند که فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز با افزایش غلظت کادمیم متناسب است.

تجزیهٔ داده‌های نشان داد که تیمار پینهٔ گیاه پریوش با دزهای ۳۰ و ۴۰ میلی‌مولار به مدت ۳ روز باعث افزایش معنی‌دار (p<۰/۰۵) فعالیت آنزیم پراکسیداز نسبت به شاهد و دز ۲۰ میلی‌مولار شد، این در حالی است که تأثیر دز ۲۰ میلی‌مولار بر فعالیت آنزیم پراکسیداز نسبت به شاهد بدون تغییر بود (p>۰/۰۵) (جدول ۳). بررسی نتایج به‌دست‌آمده از تجزیهٔ داده‌ها نشان داد که، تأثیر دزهای ۳۰ و ۴۰ میلی‌مولار نیترات کادمیم بر میزان فعالیت آنزیم کاتالاز پینهٔ گیاه پریوش تیمارشده به مدت سه روز در مقایسه با شاهد معنی‌دار (p<۰/۰۵) بود. درحالی‌که فعالیت آنزیم کاتالاز در گروه تیمار شده با دز ۲۰ میلی‌مولار نسبت به شاهد تغییر معنی‌داری نشان نداد (p>۰/۰۵) (جدول۳).

قرار گرفتن پینهٔ گیاه پریوش در معرض نیترات کادمیم در مدت‌زمان سه روز منجر به افزایش فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز و کاتالاز تحت تیمار با دزهای ۳۰ و ۴۰ میلی‌مولار شد. افزون بر گزارش انجام‌شده در این پژوهش، افزایش فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و پراکسیداز در چندین گیاه خودپرور (اتوتروف) تحت تیمار با کادمیم، روی، سرب و آهن گزارش‌شده است (Pereira *et al*., 2002; Foroozesh *et al*., 2012; Prasad *et al*., 1999; Rucinska *et al*., 1999).

آنزیم پرکسیداز در شرایط طبیعی و دفاع در برابر تنش‌های زیستی مسئول تخریب پراکسید هیدروژن است (Gill & Tuteja, 2010). این آنزیم یک آنزیم پاداکسنده است که در شرایط اکسایشی ناشی از فلزهای سنگین در گیاه فعالیت بیشتری را نشان می‌دهد (Gill & Tuteja, 2010). لذا این آنزیم در این پژوهش با غلظت‌های بالای نیترات کادمیم در مقایسه با غلظت ۲۰ میلی‌مولار افزایش فعالیت نشان داده است نه در غلظت کم. دیده شده که فعالیت GPOX، در کاج نوئل *Picea abies* L. تحت تنش کادمیوم درآغاز افزایش نشان می‌دهد و ادامهٔ تیمار با کادمیم باعث کاهش در فعالیت این آنزیم می‌شود (Radotic et al., 2000). افزون بر این در پینهٔ گیاه *Cuscuta reflexa* تحت تیمار با کادمیم نتایج همانندی گزارش شده است (Srivastava *et al*., 2004). باید به خاطر سپرد که فعالیت POX به‌صورت قابل ملاحظه‌ای وابسته به گونهٔ گیاهی و شرایط تنش است (Morais *et al*., 2012). که این خود می‌تواند دلیل اصلی اختلاف در نتایج این پژوهش و پژوهش‌های پیشین باشد.

کاتالازها آنزیم‌های تترامیک حاوی گروه هم هستند که توانایی تبدیل مستقیم پراکسید هیدروژن[1] ($H_2O_2$) (محصول سمی ناشی از فعالیت سوپراکسید دیسموتاز) به $H_2O$ و $O_2$ را دارند و برای سم‌زدایی ROS در شرایط تنش ضروری هستند (Gill & Tuteje, 2010). البته باید در نظر داشت که فعالیت این آنزیم بیشتر متوجه از بین بردن پراکسید هیدروژن تولیدشده در شرایط فیزیولوژیک است، ولی با افزایش بیش‌ازحد پراکسید هیدروژن خارج از توانایی آنزیم‌های دیگر پاداکسندگی، آنزیم کاتالاز نیز با افزاش فعالیت می‌تواند در سرکوب کردن ROS ها مشارکت کند. نتایج به‌دست‌آمده از تجزیهٔ داده‌ها نشان داد که غلظت‌های ۳۰ و ۴۰ میکرومولار نیترات کادمیم فعالیت آنزیم کاتالاز در پینهٔ گیاه پریوش تیمارشده را در مقایسه با کنترل و دز ۲۰ میلی‌مولار به‌طور

1. Hydrogen peroxidase

معنی‌دار (p<۰/۰۵) و وابسته به دز افزایش داد. این در حالی است که فعالیت این آنزیم در دز ۲۰ میلی‌مولار نسبت به کنترل تغییر معنی‌داری را نشان نداد، به‌احتمال میزان رادیکال آزاد تولیدشده توسط دز ۲۰ میلی‌مولار به‌اندازه‌ای نیست که نیازمند افزایش فعالیت آنزیم کاتالاز باشد. در تحقیقاتی که توسط Bhardwaj *et al.* (2007) روی گیاه *Phaseolus vulgaris L* صورت گرفت، نشان دادند که میزان فعالیت آنزیم کاتالاز تحت تیمار با غلظت‌های مختلف کادمیم ($۱/۵gKg^{-1}$، ۲، ۲/۵، ۳) و بسته به دز افزایش می‌یابد (Bhardwaj *et al*., 2007). البته باید در نظر گرفت که اختلاف موجود در نتایج تحقیق نام‌برده و این پژوهش می‌تواند به دلیل اختلاف در گونهٔ گیاهی از یکسو و اختلاف شرایط و تکوین گیاهی از سوی دیگر باشد.

**نتیجه‌گیری**

نتایج این تحقیق نشان داد که فلز کادمیم در غلظت‌های به‌کار رفته می‌تواند باعث کاهش معنی‌دار توانائی زیستی گیاه پریوش شده و پراکسیداسیون لیپیدهای غشائی را افزایش دهد. اگرچه سامانهٔ دفاعی آنزیمی این گیاه برای رویارویی با اثر تخریبی رادیکال‌های تولیدشده افزایش می‌یابد ولی این افزایش نتوانست بازدارندهٔ کاهش توانائی زیستی و پراکسیداسیون لیپیدهای غشائی در این گیاه در رویارویی با مسمومیت ناشی از فلز کادمیم شود.

## سپاسگزاری

از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه اراک که با ارائه کمک مالی امکان انجام این تحقیق را در قالب پایان‌نامهٔ کارشناسی ارشد ممکن نمود، تشکر و قدردانی می‌گردد.

## REFERENCES

1. Hasan, S. A., Fariduddin, Q., Ali, B., Hayat, S. & Ahmad, A. (2009). Cadmium: Toxicity and tolerance in plants. *Journal of environmental physiology*, 30(2), 165-174.
2. Bhardwaj, P., Chaturvedi, A.K. & Prasad, P. (2009). Effect of Enhanced Lead and Cadmium in soil on Physiological and Biochemical attributes of Phaseolus vulgaris L. *Nature and Science*, 7(8), 63-75.
3. Cakmak, I. & Marschner, H. (1992).Manesium deficiency and high light inensity enhance activities of superoxide dismutase, ascrobate peroxidase, and glutatione reductase in bean leaves. *Plant Physiology*, 98(4), 1222-1227.
4. Diáz, J., Bernal, A., Po Mar, F. & Merino, F. (2001). Induction of shikimate dehydrogenase and peroxidase in pepper (*Capsicum annum* L.) seedlings in response to copper stress and its relation to lignification. *Plant Science*, 161(1), 179-188.
5. Farahani, F., Zargar, M. & Nabavi, T. (2011), Anti-bacterial activity of *in vitro* produced alkaloids in *Catharanthus roseus* L. *African Journal of Microbiology Research*, 5(27), 4769-4773.
6. Fojtova M., Fulneckova J., Fajkus J. & Kovarik A. (2002). Recovery of tobacco cells from cadmium stress is accompanied by DNA repair and increased telomerase activity. *Journal Exprimental Botany*, 53(378), 2151-2158.
7. Foroozesh, P., Bahmani, R., Pazouki, A., asgharzadeh, A. & rahimdabbagh, S. (2012). Effect of cadmium stress on antioxidant enzymes activity in different bean genotypes. *ARPN Journal of Agricultural and Biological Science*, 7(5), 351-356.
8. Foyer, C.H. & Noctor, G. (2003). Redox sensing and signalling associated with reactive oxygen in chloro plants, peroxisomes and mitochondria, *physiologia Plantarum*, 119(3), 355-364.
9. Giannopolitis, C.N. & Ries, S.K. (1997). Superoxid dismutase I. occurrence in higher plants. *Plant Physiology*, 59(2), 309-317.
10. Gill, S.S & Tuteja, N. (2010). Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants.*plant physiology and biochemistry*, 48(12), 909-930.
11. Israr, M., Sahi, S. V. & Jain, J. (2006).Cadmium accumulation and antioxidative responses in the sesbania drummondii callus. *Archive Environmental contamination and Toxicology*, 50(1), 121-127.
12. Kokate, C. K. & Purohit, A. P. (2007) Text Book of Pharmacognosy. 37th edition, 484-487.
13. Lin, C. C. & Kao, C.H. (2000). Effect of NaCl stress on $H_2O_2$ metabolism in rice leaves, *Plant Growth Regulation*, 30 (2), 151-155.
14. Metwally, A., Finkemeier, I., Georgi, M. & Dietz, K. (2003). Salicylic Acid Alleviates The Cadmium Toxicity In Barley Seedlings. *Plant Physiology*, 132(1), 272- 281.
15. Michalak, A. (2006). Phenolic Compounds and Their Antioxidant Activity in Plants Growing, under Heavy Metal Stress. *Polish Journal of Environtal Studies*, 15(4), 523-530.
16. McCabe, P.F. & Leaver, C.J. (2000). Programmed cell death in cell cultures. *Plant Molcular Biology*, 44, 359-368.

17. Morais, M. C., Panuccio, M. R., Muscolo, A. & Freitas, H. (2012). Does salt stress increase the ability of the exotic legume *Acacia longifolia* to compete with native legumes in sand dune ecosystems? *Environmental and Experimental Botany*, 82, 74-79.
18. Narula, A., Kumar, S. & Srivastava, P.S. (2005). Abiotic metal stress enhances diosgenin yield in *Dioscorea bulbifera* L. cultures. *Plant Cell Reports*, 24(4), 250-254.
19. Nies, D. H. (1999). Microbial heavy-metal resistance. *Applied Microbiology Biotechnology*, 51(6), 730-750.
20. Peralta-Videa, J. R., Lopez, M. L., Narayan, M., Saupe, G. & Gardea-Torresdey, J. (2009). The biochemistry of environmental heavy metal uptake by plants: Implications for the food chain. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 41(8-9), 1665-1677.
21. Pereira, G.J.G., Molina, S.M.G., Lea, P.J. & Azevedo, R.A. (2002). Activity of antioxidant enzymes in response to cadmium in *Crotalaria juncea*. *Plant and Soil*, 239(1), 123-132.
22. Polle, A., Otter, T. & Seifert, F. (1994). Apoplastic peroxidases and lignification in needles of norway spruce" (*Picea Abies L.*). *Plant Physiology*, 106(1), 53-56.
23. Prasad, K.V., Saradhi, P.P. & Sharmila, P. (1999). Concerted action of antioxidant enzymes and curtailed growth under zinc toxicity in Brassica juncea. *Environmental and Exprimental Botany*, 42(1), 1-10.
24. Radotic, K., Ducic, T. & Mutavdžic, D. (2000).Changes in peroxidase activity and isoenzymes in spruce needles after exposure to different concentrations of cadmium. *Environmental and Exprimental Botany*, 44(2), 105-113.
25. Rucinska, R., Waplak, S. & Gwózdz, E. A. (1999). Free radical formation and activity of antioxidant enzymes in lupin roots exposed to lead. *Plant Physiology and Biochemisty*, 37(3), 187-194.
26. Sahw, B.P., Saha, S.K. & Mishra, R.K. (2004). Heavy metal induced oxidative damage interrestrial plant, In: presad, M.N.V. (ED), heavy metal stress in plants. *From Biomolecules to Ecosystem second ed.Springer*, Berlin, 84-126.
27. Saifullah & Saifullah Khan. (2011).Callus induction and cell suspension culture production of catharanthus roseus for biotransfermation studies of (-)- caryophyllene oxide. *Pakistan Journal of Botany*, 43(1), 467-473.
28. Schutzendubel, A. & Polle, A. (2002). Plant responses to abiotic stresses: heavy metal-induced oxidative stress and protection by mycorrizatio.*Journal of Experimental Botany*, 53(372), 1351-1365.
29. Srivastava, S., Tripathi, R.D. & Dwivedi, U. N. (2004).Synthesis of phytochelatins and modulation of antioxidants in response to cadmium stress in Cuscuta reflexa - an angiospermic parasite. *Journal of plant physiology*, 161(6), 665-674.
30. Sytar, O., Kumar, A., Latowski, D., Kuczynska, P., Strzałka, K. & Prasad, M. N. V. (2013). Heavy metal-induced oxidative damage, defense reactions, and detoxification mechanisms in plants. *Acta Physiologiae Plantarum*, 35(4), 985-999.
31. van Doorn, W.G. & Woltering, E. J. (2005). Many ways to exit? Cell death categories in plants. *Trends in Plant Science*, 10(3), 117-122.
32. Wajda, L., Kutemozinska, W. & Pilipowicz, M. (1989). Cadmium toxicity to plant callus culture in vitro-I. Modulation by zinc a dependence on plant species and callus line. *Environmental and Experimental Botany*, 29(3), 301-305.
33. Zhao, Y. (2011). Cadmium accumulation and antioxidative defenses in leaves of *Triticum aestivum* L. and *Zea mays* L. *African Journal of Biotechnology*, 10 (15), 2936-2943.

Iranian Journal of Horticultural Science, Vol. 47, No. 1, Spring 2016

# The effect of cadmium on viability and activity of some of the antioxidant enzymes in the callus of *Catharanthus roseus*

**Hajar Moradipoor[1], Mohammad H. Abnosi[2*], Mohamadreza Amirjani[3] and Majid Mahdiyeh[4]**
1, 2, 3, 4. Former M.Sc. Student and Assistant Professors, College of Sciences,
University of Arak, Iran
(Received: Nov. 20, 2013 - Accepted: Oct. 18, 2014)

## ABSTRACT

*Catharantus-roseus* is a medicinal and ornamental plant with growing attention toward its economical value. To determine cell viability based on trypan blue and MTT assay, cell suspension from callus of *Catharantus-roseus* were treated with different concentrations of cadmium-nitratee for 1, 3 and 6 days. Also cell suspension was used to investigate the cell morphology for a period of 3 days using 0, 20, 30 and 40 mM of cadmium nitrate. In addition, the callus was also treated for a same period and concentrations to estimate the level of lipid peroxidation and the activity of superoxide dismutase, catalase and guaiacol peroxidase. Data was analysed using one-way-ANOVA (Duncan-test) and $p<0.05$ was taken as the level of significant. The data from trypan blue and MTT methods showed the significant ($p<0.05$) differences in callus viability related to doses compared with control. In addition activity of the investigated enzymes increased significantly ($p<0.05$) in accordance with cadmium nitrate consumption. The malondialdehyde levels as a lipid peroxidation indicator increased in accordance with cadmium nitrate consumption significantly. Cadmium nitratee caused cellular membrane damage and cell viability reduction in the callus of *Catharantus roseus*. Activity of the antioxidant enzymes increased significantly but was not able to compensate the caused damages.

**Keywords:** antioxidant enzymes, cadmium nitrate, catharantus roseus callus, cellular response, malondialdehyde.

* Corresponding author E-mail: m-abnosi@araku.ac.ir Tel: +98 863 2211454