

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

هاجر مرادی پور<sup>۱</sup>، محمدحسین آبنوسی<sup>۲\*</sup>، محمدرضا امیرجانی<sup>۳</sup> و مجید مهدیه<sup>۴</sup>

۱، ۲، ۳ و ۴. دانشجوی سابق کارشناسی ارشد و استادیار، دانشکده علوم، دانشگاه اراک

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۸/۲۹ - تاریخ تصویب: ۱۳۹۳/۷/۲۶)

### چکیده

پرپوش گیاهی زینتی و دارویی است که از نظر اقتصادی نیز اهمیت دارد. از پینه (کالوس) گیاه پرپوش دروایه (سوسپانسیون) یاخته‌ای تهیه و پس از تیمار با دزهای مختلف نیترا کادمیم به مدت ۱، ۳، ۶ 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 ۴۰ میلی‌مولار به مدت سه روز استفاده شد. داده‌ها به روش ANOVA یک‌سویه و آزمون دانکن تجزیه (آنالیز) و  $P < 0/05$  به‌عنوان سطح معنی‌داری در نظر گرفته شد. داده‌های تریپان بلو و MTT نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار ( $p < 0/05$ ) میانگین توانائی زیستی به‌صورت وابسته به دز در مقایسه با کنترل بود. همچنین فعالیت آنزیم‌های موردبررسی در پاسخ به تنش اکسایشی (اکسیداتیوی) ناشی از نیترا کادمیم افزایش معنی‌دار ( $p < 0/05$ ) نشان داد. میزان مالون دی آلدئید به‌عنوان محصول پراکسیداسیون لیپید نیز با افزایش معنی‌دار همراه بود. نیترا 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، پینه گیاه پرپوش، مالون دی آلدئید، نیترا 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 از نظر سوخت‌وسازی (متابولیکی) عناصری بااهمیت زیستی متوسط هستند (Schutzendubel & Polle, 2001). ولی آرسنیک، جیوه، کادمیم، سرب و بیسموت، از دسته ریزمغذی‌های ضروری برای موجود زنده نبوده و برای گیاهان و ریزموجود (میکروارگانیسم)‌ها سمی هستند (Peralta-vidua et al., 2009; Michalak, 2006). باین‌حال غلظت بالای همه فلزها منجر به مهار رشد و

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 دی‌آلدئید در نتیجه 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 ضد ویروس 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 از یک سو و فعالیت آنزیم‌های پاداکسندگی به‌عنوان پاسخ یاخته‌ای برای رفع تنش در پینه‌ این گیاه تیمار شده با فلز سنگین کادمیم از سوی دیگر بررسی و ارزیابی شد.

## مواد و روش‌ها

### تهیه 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 بافاصله مناسب کاشته شدند. گلدان‌ها با محلول هوگلند ۱/۲ آبیاری و در اتاق کشت با دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی با شدت نور ۱۶۰۰۰ لوکس و ۸ ساعت تاریکی نگهداری شدند. دمای محیط در روز  $28 \pm 2$  درجه سلسیوس و در شب  $25 \pm 2$  درجه 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 اتوکلاو شده شستشو و به مدت ۱۰ دقیقه در اتانول ۷۰ درصد نیز قرار گرفتند. باردیگر قطعه‌ها چندین مرتبه با آب اتوکلاو شده شستشو و سپس قطعه‌ها به طول

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<sup>۱</sup> است که به‌طور معمول 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 به‌وسیله 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<sup>۲</sup> 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 گیرنده خوب الکترون‌های منفرد هستند، بنابراین احتمال انتقال تک الکترون به اکسیژن را افزایش داده و به‌طور کلی تولید انواع اکسیژن واکنش‌گر و بروز اکسایش (اکسیداسیون) را افزایش می‌دهند (Michalak, 2006). این عناصر مسیره‌های 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 یاخته 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، زوده می‌شوند (Foyer & Noctor, 2003). ولی تعادل بین تولید و پالایش ROS ممکن است به‌وسیله تنش‌های زیستی و غیرزیستی متفاوتی

1. Reactive oxygen species  
2. Scavenger enzymes

مدت ۲ دقیقه در اتاقک رشد ۳۷ درجه 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.

$$100 \times \frac{\text{تعداد سلول‌های زنده}}{\text{تعداد کل سلول‌ها}} = \text{درصد توانایی زیستی}$$

(۲) شمار ۸۰۰۰۰ یاخته به هر سینی ۲۴ خانه اضافه و محیط دروایه حاوی نیترات کادمیم در غلظت‌های ۰، ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰، ۵۰، ۶۰ میلی‌مول با سه تکرار به ترتیب به هر خانه 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<sup>۳</sup> اضافه و به مدت ۴ ساعت در اتاقک رشد ۳۷ درجه سلسیوس انکوبه شد. پس از سپری شدن این مدت محیط رویی هر چاهک تخلیه و به‌منظور حل شدن بلورهای فورمازان ۱۰۰ میکرولیتر دی‌متیل سولفواکسید<sup>۴</sup> 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 طول موج ۵۰۵ نانومتر با استفاده از ELISA-reader (شرکت SCO GmbH کشور آلمان) خوانده شد. داده‌ها به‌صورت درصد توانایی زیستی یاخته‌های تیمار شده 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. دروایه یاخته‌ای حاوی نیترات کادمیم با غلظت‌های ۰،

۱-۰/۵ سانتی‌متر روی محیط کشت MS<sup>۱</sup> حاوی ساکارز با غلظت ۳۰ گرم در لیتر به‌عنوان منبع کربن، ویتامین‌ها شامل، تیامین (با غلظت ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر)، پیروودوکسین (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 کاینیتین (با غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر) و ۲ و ۴ دی کلروفنوکسی استیک اسید (2,4-D) (با غلظت ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر) قرار گرفتند. این قطعه‌ها در نهایت در اتاق کشت با دمای ۲۵-۲۷ درجه 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 دروایه یاخته‌ای

پینه در محیط کشت مایع MS بدون آگار قرار گرفته و روی دستگاه لرزا (شیکر) با دور rpm ۱۰۰ در ۲۵ درجه سلسیوس در تاریکی نگهداری (انکوبه) شد. نمونه‌ها به‌طور مرتب 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، در نهایت یاخته‌های افزون‌شده برای بررسی توان‌زیستی و زیست‌شناسی پس از واکشت سوم استفاده شدند (Saifullah & Saifullah, 2012).

#### بررسی توان‌زیستی یاخته‌ها (یافتن دز مؤثر) به کمک آزمون تریپان بلو و روش رنگ‌سنجی<sup>۲</sup>

(۱) برای این منظور ۸۰۰۰۰ یاخته، در هر سینی (پلیت) ۲۴ خانه اضافه شد. محیط دروایه حاوی نیترات کادمیم در غلظت‌های ۰، ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰، ۵۰، ۶۰ میلی‌مول با سه تکرار به ترتیب به هر خانه سینی ۲۴ خانه اضافه و سینی‌ها به محفظه 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

3. 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide  
4. DMSO (dimethyl sulfoxide)

1. Murashige and Skoog  
2. MTT

$H_2O_2$  ۳۷ درصد و ۵۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی به عنوان مخلوط واکنش تهیه شد. افزایش جذب به دلیل اکسایش گایاکول در طول موج ۴۷۰ نانومتر به مدت ۳ دقیقه با روش طیفسنج نوری (اسپکتروفتومتر، مدل T80+ شرکت PG کشور انگلستان) اندازه‌گیری و در نهایت فعالیت آنزیم پراکسیداز با استفاده از ضریب خاموشی معادل  $26/6 \text{ mmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$  محاسبه و برحسب یک واحد (میکرومول تترآگایاکول تولیدشده در دقیقه) بر میلی‌گرم پروتئین بیان شد (Polle *et al.*, 1994).

فعالیت آنزیم CAT با روش طیفسنج نوری و بر پایه کاهش جذب  $H_2O_2$  به مدت ۵ دقیقه در طول موج 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 عصاره آنزیمی بود. میزان فعالیت آنزیم با طیفسنج نوری (مدل T80+ شرکت PG کشور انگلستان) قرائت با استفاده از ضریب خاموشی معادل  $36 \text{ mmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$  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 عصاره 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 نیتروبلوتترازولیوم<sup>۵</sup> در ۵۶۰ نانومتر می‌شود. میزان فعالیت آنزیم برحسب یک واحد در دقیقه به ازای میلی‌گرم پروتئین محاسبه شد (Giannopolitis & Rise, 1977).

۲۰، ۳۰، ۴۰ میلی‌مول بر میلی‌لیتر و با سه تکرار به ترتیب به هر خانه 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<sup>۱</sup> 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 ساختار ظاهری سیتوپلاسم، رنگ‌آمیزی یاخته‌ها برابر مراحل یادشده با محلول آکریدین اورانژ به مدت ۲ دقیقه انجام و توسط میکروسکوپ فلورسنس بررسی و عکس‌برداری شد.

#### استخراج عصاره آنزیمی

میزان ۰/۵ گرم از بافت پینه با استفاده از نیتروژن مایع سائیده و توسط ۱ میلی‌لیتر بافر فسفات پتاسیم ۱۰۰ میلی‌مولار (pH=۷) استخراج شد. ترکیب حاصل در دمای ۴ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۱۲۰۰۰ rpm سانتیفریوژ شد و از محلول شفاف رویی که حاوی عصاره آنزیمی بود برای تعیین میزان فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز<sup>۲</sup>، سوپراکسیددیسموتاز<sup>۳</sup>، کاتالاز<sup>۴</sup> استفاده شد. میزان پروتئین کل نمونه‌ها توسط روش لوری تعیین و پس از رسم منحنی استاندارد با استفاده از BSA توسط فرمول خطی  $y = 0/1885x + 0/084$  و  $R^2 = 0/996$  محاسبه شد.

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

فعالیت آنزیم POX با استفاده از گایاکول به عنوان کروموژن اندازه‌گیری شد. در این روش ۳ میلی‌لیتر محلول بافر فسفات پتاسیم ۱۰۰ میلی‌مولار (pH=۷)، ۵۰ میکرولیتر گایاکول ۲۰ میلی‌مولار، ۵۰ میکرولیتر

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

5. NBT (nitroblue tetrazolium)

کادمیم بر توانایی زیستی یاخته‌های پینه گیاه پرپوش اثر متقابل داشت (جدول نشان داده نشد). این درحالی است که در نتایج رنگ‌آمیزی با تریپان بلو در گروه‌های تیمار شده در روز اول LD50 در حدود غلظت ۴۰ میلی‌مولار مشاهده شد، در صورتی که در روز سوم نیز LD50 در حدود غلظت ۴۰ میلی‌مولار و در روز ششم LD50 در غلظت ۳۰ میلی‌مولار مشاهده شد، از سوی میزان LD75 برای روزهای ۱، ۳ و ۶ در حدود به ترتیب در غلظت‌های ۶۰، ۵۰ و ۴۰ قابل مشاهده 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 پینه گیاه پرپوش 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 گزارش شده توسط Wajda et al. (1989) نشان داده شد که با افزایش غلظت کلرید کادمیم (۰ تا ۴۴/۹۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر) و افزایش زمان (۱ تا ۲۷ روز) توانایی زیست پینه گیاه پرپوش وابسته به دز و زمان کاهش معنی‌دار یافته است. نتایج این تحقیق نیز برابر با این گزارش مبنی بر وابسته بودن توانایی زیست یاخته‌های پینه گیاه پرپوش به دز و زمان تیمار با نیترات کادمیم بود.

#### انتخاب دز برای ادامه بررسی

با توجه به نتایج به‌دست‌آمده از آزمون رنگ‌آمیزی تریپان بلو و رنگ‌سنجی MTT مشخص شد که همه دزها نسبت به یکدیگر تفاوت معنی‌داری را نشان دادند. از آنجاکه 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 در حدود 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.

#### 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 ۴۰۰۰ rpm به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفوژ شد. سپس ۲ میلی‌لیتر از محلول رویی و ۲ میلی‌لیتر از محلول تری کلرواستیک اسید ۱۰ درصد حاوی ۰/۵ درصد تیوباریبوتیک اسید را در حمام آب گرم در دمای ۱۰۰ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ دقیقه قرار داده و به مدت ۱۵ دقیقه در یخ قرار گرفت تا سرد شود. جذب محلول در طول موج ۶۰۰ نانومتر خوانده شد و از جذب خوانده شده در طول موج ۵۳۲ نانومتر کم شد. از تری کلرواستیک اسید ۱۰ درصد حاوی ۰/۵ درصد تیوباریبوتیک اسید برای صفر کردن دستگاه استفاده شد. غلظت کمپلکس تیوباریبوتیک-مالون‌دی‌آلدئید با استفاده از ضریب خاموشی  $\epsilon = 155 \text{ mmol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  محاسبه و به‌صورت میکرومول بر گرم وزن خشک بافت پینه گزارش شد (Metwally et al., 2003).

#### تجزیه و تحلیل آماری

تجزیه و تحلیل آماری همه داده‌های با استفاده از نرم‌افزار SPSS-16 و ANOVA یک‌سویه انجام پذیرفت. میانگین شاخص‌های اندازه‌گیری شده با استفاده از آزمون دانکن گروه‌بندی و  $p < 0.05$  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 پینه گیاه پرپوش در زمان‌های ۱، ۳، ۶ روزه با غلظت‌های ۱۰ تا ۶۰ میلی‌مولار نیترات کادمیم موجب کاهش معنی‌دار ( $p < 0.05$ ) و وابسته به دز یا میزان توانایی زیستی در مقایسه با شاهد شد. هم‌چنین تجزیه داده‌ها به‌روش دوسویه (Two way ANOVA,  $p < 0.05$ ) نشان داد که دزهای متفاوت و زمان‌های مختلف با نیترات

جدول ۱. مقایسه 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 nitrate using trypan blue staining

Levels (mM)	Days		
	1	3	6
0	91.10 <sup>a</sup> ±0.96	89.77 <sup>a</sup> ±0.39	91.06 <sup>a</sup> ±1.02
10	81.80 <sup>b</sup> ±0.77	79.93 <sup>b</sup> ±0.85	74.01 <sup>b</sup> ±1.51
20	75.70 <sup>c</sup> ±0.15	66.17 <sup>c</sup> ±0.89	59.87 <sup>c</sup> ±0.17
30	69.83 <sup>d</sup> ±0.44	52.54 <sup>d</sup> ±0.67	45.37 <sup>d</sup> ±0.24
40	40.07 <sup>e</sup> ±0.20	42.77 <sup>e</sup> ±0.57	20.07 <sup>e</sup> ±0.50
50	32.48 <sup>f</sup> ±1.05	32.59 <sup>f</sup> ±0.22	11.85 <sup>f</sup> ±0.02
60	21.02 <sup>g</sup> ±0.07	15.75 <sup>g</sup> ±0.64	4.67 <sup>g</sup> ±0.69

مقادیر به صورت 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 differ significantly. (one way ANOVA, Duncan test, p<0.05).

جدول ۲. مقایسه 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 nitrate using MTT assay

Levels (mM)	Days		
	1	3	6
0	91.73 <sup>a</sup> ±0.59	90.77 <sup>a</sup> ±0.28	93.1 <sup>a</sup> ±0.61
10	74.50 <sup>b</sup> ±0.76	59.81 <sup>b</sup> ±0.23	55.04 <sup>b</sup> ±0.21
20	63.18 <sup>c</sup> ±0.36	54.31 <sup>c</sup> ±0.14	44.99 <sup>c</sup> ±0.12
30	54.02 <sup>d</sup> ±0.37	45.50 <sup>d</sup> ±0.15	29.47 <sup>d</sup> ±0.18
40	49.37 <sup>e</sup> ±0.13	35.87 <sup>e</sup> ±0.44	19.66 <sup>e</sup> ±0.14
50	33.25 <sup>f</sup> ±0.19	18.39 <sup>e</sup> ±0.15	9.33 <sup>f</sup> ±0.12
60	22.21 <sup>g</sup> ±0.50	14.26 <sup>g</sup> ±0.44	3.50 <sup>g</sup> ±0.20

مقادیر به صورت 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 differ significantly. (one way ANOVA, Duncan test, p<0.05).

یاخته‌های تیمار شده با ایجاد زائده و ازهم‌پاشیدگی سیتوپلاسمی همراه بود. مرگ یاخته‌ای با تنش فلزهای سنگین مانند یون‌های کادمیم القا می‌شود که در گیاهان به‌عنوان مرگ برنامه‌ریزی شده<sup>۱</sup> و نکروزیس طبقه‌بندی می‌شود. PCD به‌عنوان الگوی فعال مرگ یاخته‌ای است که با ژن‌ها کنترل شده و مشخصه آن در گیاهان شامل، چروکیدگی یاخته، متراکم شدن کروماتین، شکست رشته‌ای DNA و قطعه‌قطعه شدن DNA است (McCabe & Leaver, 2000; Van Doorn & 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 یاخته پینه گیاه پرپوش و تغییر در ساختار ظاهری یاخته

### تأثیر نیترات کادمیم بر ساختار ظاهری یاخته‌های تیمار شده

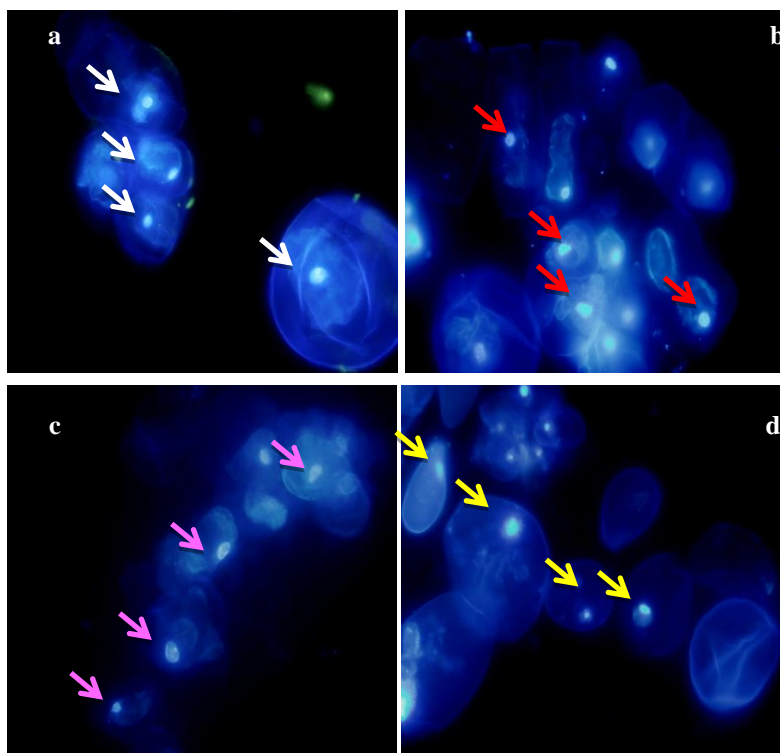
یاخته‌های تیمار شده با رنگ‌آمیزی فلورسنت هوخست در مقایسه با گروه شاهد نشان داد که هسته یاخته‌ها دچار تغییرپذیری‌های ساختار ظاهری، مانند فشردگی کروماتین، کوچک شدن هسته و تغییر مکان آن نسبت به کنترل شد. این تغییرپذیری‌های در غلظت‌های بالاتر (۴۰ میلی‌مولار) چشمگیرتر بود (شکل ۱) که منجر به خرد شدن و از بین رفتن هسته شد. یاخته‌های تیمار شده با نیترات کادمیم با دز ۲۰، ۳۰ و ۴۰ میلی‌مولار از نظر سیتوپلاسمی نیز دچار تغییرپذیری‌های ساختار ظاهری بارزی مانند چروکیدگی و تغییر در حاشیه سیتوپلاسم یاخته تیمار شده نسبت به گروه کنترل شد (شکل ۲). لازم به یادآوری است که حاشیه سیتوپلاسمی در یاخته‌های گروه کنترل بسیار صاف و یکدست بود در صورتی که این حاشیه‌ها در

1. PCD (programmed cell death)

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 نشان‌دهنده افزایش پراکسیداسیون لیپید و تخریب بیشتر غشاء است. Zhao *et al.* (2011) روی گیاه گندم و ذرت نشان دادند که ۰/۱ ، ۰/۱ و ۱ میلی‌گرم بر لیتر کادمیم منجر به افزایش میزان مالون دی آلدئید وابسته به دز شد.

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

**تأثیر نیترات کادمیم بر میزان مالون دی آلدئید**  
تجزیه آماری داده‌ها نشان داد که تیمار پینه گیاه پرپوش با دزهای ۳۰ و ۴۰ میلی‌مولار نیترات کادمیم به مدت سه روز باعث افزایش معنی‌دار ( $P < 0/05$ ) 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 ( $P > 0/05$ ) (جدول ۳). به‌طورعموم برای ارزیابی آسیب به غشاهای زیستی و پراکسیداسیون لیپیدی از نشانگر (مارکر) زیستی مالون‌دی‌آلدئید



شکل ۱. رنگ‌آمیزی یاخته‌های پینه گیاه پرپوش با رنگ فلورسنت هوشست پس از سه روز تنش. (a) یاخته‌های گروه کنترل پیکان‌ها، هسته یاخته عادی را نشان می‌دهد. (b) یاخته‌های تیمار شده با ۲۰ میلی‌مولار نیترات کادمیم ، پیکان‌ها تغییر مکان و متراکم شدن هسته را نشان می‌دهد. (c) یاخته‌های تیمار شده با ۳۰ میلی‌مولار نیترات کادمیم ، پیکان‌ها قطعه‌قطعه شدن هسته و مهاجرت آنها به طرف غشاء سیتوپلاسمی را نشان می‌دهد. (d) یاخته‌های تیمار شده با ۴۰ میلی‌مولار نیترات کادمیم ، پیکان‌ها خروج هسته از یاخته را نشان می‌دهد (بزرگ‌نمایی ۴۰x)

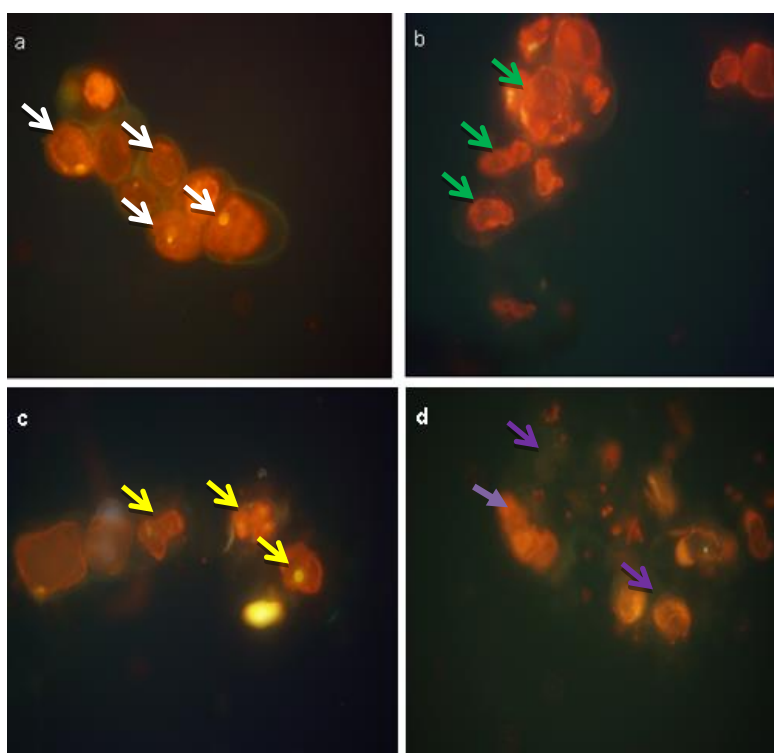
Figure 1. Staining of *C. roseus* callus cells with Hoechst fluorescent dye after 3 days of stress. (a) cells of the control group, the arrows show the nuclei in the normal cells. (b) cells treated with 20 mM of cadmium nitrate, arrows show the dislocalization and condensation of the nuclei. (c) cells 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. مقایسه میانگین محتوای مالون دی آلدئید ( $\mu\text{M}^{-1}\text{FW}$ ) و فعالیت آنزیم‌های سوپراکسیددیسموتاز ( $\text{unit min}^{-1}\text{mg}^{-1}\text{protein}$ )، پراکسیداز ( $\text{unit min}^{-1}\text{mg}^{-1}\text{protein}$ ) و کاتالاز ( $\text{unit min}^{-1}\text{mg}^{-1}\text{protein}$ ) پینه گیاه پرپوش سه روز پس از تیمار با نیترات کادمیم (۲۰، ۳۰ و ۴۰ میلی‌مولار)

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

Levels (mM) of cadmium nitrate	catalase ( $\text{unit min}^{-1}\text{mg}^{-1}\text{protein}$ )	peroxidase ( $\text{unit min}^{-1}\text{mg}^{-1}\text{protein}$ )	Superoxide dismutase ( $\text{unit mg}^{-1}\text{protein}$ )	malondialdehyde ( $\mu\text{mol g}^{-1}\text{FW}$ )
0	$0.78^{\text{a}} \pm 0.03$	$0.46^{\text{a}} \pm 0.04$	$20.17^{\text{a}} \pm 0.07$	$0.11^{\text{a}} \pm 0.01$
20	$0.84^{\text{ab}} \pm 0.05$	$0.84^{\text{a}} \pm 0.07$	$21.75^{\text{a}} \pm 0.10$	$0.10^{\text{a}} \pm 0.01$
30	$1.45^{\text{c}} \pm 0.11$	$1.27^{\text{b}} \pm 0.15$	$29.22^{\text{b}} \pm 0.03$	$0.20^{\text{b}} \pm 0.00$
40	$2.06^{\text{d}} \pm 0.09$	$2.37^{\text{c}} \pm 0.55$	$34.70^{\text{c}} \pm 0.00$	$0.31^{\text{c}} \pm 0.02$

مقادیر به صورت  $\pm\text{SD}$  means است. میانگین‌ها با کد حرف‌های متفاوت در یک ستون تفاوت معنی‌دار دارند ( $p < 0.05$ ) (one way ANOVA, Duncan test). Values are means  $\pm$  SD. Means with different letter code in a column differ significantly. (one way ANOVA, Duncan test,  $p < 0.05$ ).



شکل ۲. رنگ‌آمیزی یاخته‌های پینه گیاه پرپوش بارنگ فلورسنت آکریدین اورنژ پس از سه روز تنش. (a) یاخته‌های گروه کنترل، حاشیه سیتوپلاسم صاف و یکنواخت است (b) یاخته‌های تیمار شده با ۲۰ میلی‌مولار نیترات کادمیم، پیکان‌ها چروکیدگی سیتوپلاسم را نشان می‌دهد. (c) یاخته‌های تیمار شده با ۳۰ میلی‌مولار نیترات کادمیم، پیکان‌ها پارگی سیتوپلاسم را نشان می‌دهد. (d) یاخته‌های تیمار شده با ۴۰ میلی‌مولار نیترات کادمیم، پیکان‌ها جسم یاخته‌ای بدون هسته را نشان می‌دهد (بزرگ‌نمایی ۲۰x)

Figure 2. Staining of *C. roseous* callus cells with acridine orange fluorescent dye after 3 days of stress. (a) cells of the control group, the cytoplasm margin is smooth and continuous. (b) cells treated with 20 mM of cadmium nitrate, arrows show cytoplasm shrinkage. (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)

دزهای ۳۰ و ۴۰ میلی‌مولار نیترات کادمیم موجب افزایش معنی‌دار فعالیت این آنزیم نسبت به شاهد شد ( $P < 0.05$ ). این در حالی است که دز ۲۰ میلی‌مولار هیچ‌گونه تغییر معنی‌داری نسبت به شاهد نشان نداد

تأثیر نیترات کادمیم بر فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز و پراکسیداز تجزیه آماری داده‌های به‌دست‌آمده از اندازه‌گیری فعالیت آنزیم SOD پینه گیاه پرپوش تیمار شده با



Pereira et al., 2002; Foroozesh et al., 2012; )  
(Prasad et al., 1999; Rucinska et al., 1999

آنزیم پراکسیداز 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 نیتراکسید 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 کادمیم در آغاز افزایش نشان می‌دهد و ادامه تیمار با کادمیم باعث کاهش در فعالیت این آنزیم می‌شود (Radotic et al., 2000). افزون بر این در پینه گیاه *Cuscuta reflexa* تحت تیمار با کادمیم نتایج همانندی گزارش شده است (Srivastava et al., 2004). باید به خاطر سپرد که فعالیت POX به صورت قابل ملاحظه‌ای وابسته به گونه 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<sup>۱</sup> ( $H_2O_2$ ) (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 & Tuteja, 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 افزایش فعالیت می‌تواند در سرکوب کردن ROS ها مشارکت کند. نتایج به دست آمده از تجزیه داده‌ها نشان داد که غلظت‌های ۳۰ و ۴۰ میکرومولار نیتراکسید کادمیم فعالیت آنزیم کاتالاز در پینه گیاه پرپوش تیمار شده را در مقایسه با کنترل و دز ۲۰ میلی‌مولار به‌طور

( $p > 0.05$ ) (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 نیتراکسید 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 با اهمیت 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 پینه 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.

تجزیه داده‌های نشان داد که تیمار پینه گیاه پرپوش با دزهای ۳۰ و ۴۰ میلی‌مولار به مدت ۳ روز باعث افزایش معنی‌دار ( $p < 0.05$ ) 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 ( $p > 0.05$ ) (جدول ۳). بررسی نتایج به دست آمده از تجزیه داده‌ها نشان داد که، تأثیر دزهای ۳۰ و ۴۰ میلی‌مولار نیتراکسید کادمیم بر میزان فعالیت آنزیم کاتالاز پینه گیاه پرپوش تیمار شده به مدت سه روز در مقایسه با شاهد معنی‌دار ( $p < 0.05$ ) بود. در حالی که فعالیت آنزیم کاتالاز در گروه تیمار شده با دز ۲۰ میلی‌مولار نسبت به شاهد تغییر معنی‌داری نشان نداد ( $p > 0.05$ ) (جدول ۳).

قرار گرفتن پینه گیاه پرپوش در معرض نیتراکسید کادمیم در مدت زمان سه روز منجر به افزایش فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز و کاتالاز تحت تیمار با دزهای ۳۰ و ۴۰ میلی‌مولار شد. افزون بر گزارش انجام شده در این پژوهش، افزایش فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و پراکسیداز در چندین گیاه خودپرور (اتوتروف) تحت تیمار با کادمیم، روی، سرب و آهن گزارش شده است

### نتیجه‌گیری

نتایج این تحقیق نشان داد که فلز کادمیم در غلظت‌های به‌کار رفته می‌تواند باعث کاهش معنی‌دار توانائی زیستی گیاه پریش شده و پراکسیداسیون لیپیدهای غشائی را افزایش دهد. اگرچه سامانه دفاعی آنزیمی این گیاه برای رویارویی با اثر تخریبی رادیکال‌های تولیدشده افزایش می‌یابد ولی این افزایش نتوانست بازدارنده 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 پایان‌نامه کارشناسی ارشد ممکن نمود، تشکر و قدردانی می‌گردد.

معنی‌دار ( $p < 0.05$ ) 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 ( $1/5, 2, 3, 5, 10 \text{ mg Kg}^{-1}$ ) 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 گونه گیاهی از یکسو و اختلاف شرایط و تکوین گیاهی از سوی دیگر باشد.

### REFERENCES

- 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.
- 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.
- Cakmak, I. & Marschner, H. (1992). Manganese deficiency and high light intensity enhance activities of superoxide dismutase, ascorbate peroxidase, and glutathione reductase in bean leaves. *Plant Physiology*, 98(4), 1222-1227.
- 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.
- 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.
- 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 Experimental Botany*, 53(378), 2151-2158.
- 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.
- 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.
- Giannopolitis, C.N. & Ries, S.K. (1997). Superoxid dismutase I. occurrence in higher plants. *Plant Physiology*, 59(2), 309-317.
- 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.
- 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.
- Kokate, C. K. & Purohit, A. P. (2007) Text Book of Pharmacognosy. 37th edition, 484-487.
- Lin, C. C. & Kao, C.H. (2000). Effect of NaCl stress on  $\text{H}_2\text{O}_2$  metabolism in rice leaves, *Plant Growth Regulation*, 30 (2), 151-155.
- Metwally, A., Finkemeier, I., Georgi, M. & Dietz, K. (2003). Salicylic Acid Alleviates The Cadmium Toxicity In Barley Seedlings. *Plant Physiology*, 132(1), 272- 281.
- 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.
- 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 Experimental Botany*, 42(1), 1-10.
24. Radotic, K., Ducic, T. & Mutavdzic, D. (2000). Changes in peroxidase activity and isoenzymes in spruce needles after exposure to different concentrations of cadmium. *Environmental and Experimental Botany*, 44(2), 105-113.
25. Rucinska, R., Waplak, S. & Gwózdź, E. A. (1999). Free radical formation and activity of antioxidant enzymes in lupin roots exposed to lead. *Plant Physiology and Biochemistry*, 37(3), 187-194.
26. Sahw, B.P., Saha, S.K. & Mishra, R.K. (2004). Heavy metal induced oxidative damage interrestrial plant, In: Prasad, 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 biotransformation 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 mycorrhizatio. *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.

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

Hajar Moradipoor<sup>1</sup>, Mohammad H. Abnosi<sup>2\*</sup>, Mohamadreza Amirjani<sup>3</sup> and Majid Mahdiyeh<sup>4</sup>

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

*Catharanthus-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 *Catharanthus-roseus* were treated with different concentrations of cadmium-nitrate 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 nitrate caused cellular membrane damage and cell viability reduction in the callus of *Catharanthus 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.