

بررسی اثر کادمیوم بر روی رشد و مورفولوژی ریشه‌های زعفران (*Crocus sativus* L.)

مریم استادشریف^۱، عزت‌اله کیهانی^۱، بهروز شاهسون بهبودی^۲ و داریوش مینایی تهرانی^۱

۱- مرکز تحقیقات بیوشیمی و بیوفیزیک دانشگاه تهران، تهران/ایران صندوق پستی ۱۳۸۴-۱۳۱۴۵

۲- گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه تهران، تهران/ایران. صندوق پستی ۶۴۵۵-۱۴۱۵۵

(دریافت: ۷۹/۱۲/۱۰؛ پذیرش: ۸۰/۸/۲۷)

چکیده

این تحقیق در مورد اثر فلز کادمیوم بر روی رشد و مورفولوژی ریشه‌های زعفران (*Crocus sativus* L.) به کمک میکروسکوپ نوری می‌باشد. پیازهای زعفران در داخل آب مقطر به عنوان شاهد و در تیمارها در غلظت ۵ mg/l تا ۵۰ mg/l سولفات کادمیوم به مدت سه روز قرار داده شدند. در هر روز اندازه‌گیری رشد طولی و تعداد ریشه‌ها انجام شد و پس از آن مورفولوژی ریشه‌ها مورد بررسی قرار گرفت. در اولین روز نتایج حاصل از شمارش ریشه‌ها نشان داد که کاهش حدود ۶۰٪-۲۰٪ در تعداد ریشه‌ها نسبت به شاهد وجود دارد، در حالیکه در روز دوم و سوم تعداد ریشه‌ها در هر پیاز نزدیک به محلول شاهد بود. در غلظتهای بالای ۲ mg/l سولفات کادمیوم در روز اول تعداد ریشه‌ها در مقایسه با شاهد ۳۷٪ و در روزهای دوم و سوم نزدیک به شاهد بودند. غلظت بحرانی کادمیوم برای ریشه‌های زعفران تقریباً ۵ mg/l تخمین زده می‌شود. بطوریکه در بالای این غلظت در همان روز اول رشد کاملاً مهار می‌گردد، اما در زیر غلظت بحرانی، رشد کاهش نشان می‌دهد. در مشاهدات با میکروسکوپ نوری مشخص شد که: تغییرات واضح مورفولوژیکی در سلول‌های ناحیه استوانه مرکزی و اپیدرم و لایه‌های زیر اپیدرم از غلظت ۵ mg/l به بالا مشاهده می‌شود. در سلولهای مریستمی و سلولهای ناحیه کلاهک تغییرات مورفولوژیکی هسته و سیتوپلاسم در غلظت ۲ mg/l و بالاتر از آن مشاهده می‌گردد. این نتایج با مقایسه نسبت سطح سیتوپلاسم/ سطح هسته نیز ثابت می‌گردد. بنابراین مشخص می‌شود که سلولهای ناحیه مریستمی و کلاهک نسبت به سایر نواحی بیشترین حساسیت را به اثرات سمی کادمیوم دارند اما با این حال مرگ سلولها نخست در منطقه کلاهک دیده می‌شود.

واژه‌های کلیدی: اثر کادمیوم، مورفولوژی ریشه، رشد ریشه، زعفران، *Crocus sativus*

مقدمه

زعفران گیاه باارزشی است که دارای اهمیت اقتصادی، دارویی و تغذیه‌ای می‌باشد. از آنجاییکه ریشه‌دهی مناسب در خاک برای رشد گیاه و در نتیجه کیفیت محصول اهمیت دارد، تحقیقات بر روی ریشه‌دهی این گیاه مانند گلدهی آن حائز اهمیت می‌باشد (بهنیا، ۱۳۷۰). از عواملی که می‌تواند رشد ریشه را متوقف کند، وجود فلزات سنگین در خاکهای مزروعی است که قادرند مسیرهای استرس اکسیداتیو (Oxidative Stress) را در درون سلول راه‌اندازی کنند (Ahmad, 1995). مسیرهای نامبرده قادرند از طریق واکنشهای تخریب DNA ایجاد تنگنا کنند و یا مرگ سلولها را به‌همراه داشته باشند (Keyer *et al.*, 1996; Halliwell *et al.*, 1990).

مرگ برنامه‌ریزی شده سلول یا Programmed Cell Death (PCD) در واقع فرآیند فعال و پویایی است که در طی مراحل مختلف رشد موجود زنده و در پاسخ به عوامل محیطی اتفاق می‌افتد (Pennell, 1997; Greenberg, 1996).

مرگ برنامه‌ریزی شده از لحاظ مورفولوژیکی تغییراتی را در سلول بوجود می‌آورد. این تغییرات با کاهش حجم سلول آغاز شده که مربوط به از دست دادن آب می‌باشد (Cohen, 1993)؛ پس از آن میتوکندری از لحاظ عملکردی متحول می‌گردد. عمده‌ترین این تحولات، کاهش پتانسیل درون غشایی میتوکندری است که به دنبال آن نفوذپذیری منافذ میتوکندریایی افزایش یافته و Ca^{2+} از درون این اندامک وارد سیتوزول می‌شود (Frade, *et al.*, 1997).

به دنبال آن، تغییرات هسته‌ای که شامل حاشیه‌ای شدن (Margination) کروماتین، فشردگی هسته (Condensation)، قطعه‌قطعه شدن DNA (Fragmentation) هسته‌ای به قطعات تقریباً ۵۰ Kbp است، اتفاق می‌افتد. این تغییرات با چروکیدگی (Shrinkage) سیتوپلاسم ادامه می‌یابد، اجسام آپتوتیک (Apoptotic bodies) تشکیل می‌گردد و نهایتاً بلعیده شدن آن توسط فاگوسیتها انجام می‌پذیرد. لازم به ذکر است که تمام مراحل فوق به جز مرحله فاگوسیت شدن در گیاهان مشاهده شده است، اما این مرحله در گیاهان به دلیل داشتن دیواره سلولی، وجود ندارد (Greenberg, 1996; Hengartner *et al.*, 2000).

به دنبال به هم خوردن هومئوستازی سلول، مراحل متابولیکی میتوکندری و سیتوزول نیز مختل می‌گردد (Greenspan, 1994; Slater *et al.*, 1995). نکروزیس (Necrosis) نیز به عنوان نوعی مرگ سلولی شناخته شده است. در این نوع مرگ به غشای سیتوپلاسمی سلولها آسیبها و صدمات زیادی وارد می‌شود، به طوریکه دیگر در تنظیم فشار اسمزی سلول نقش ندارند. علائم نکروزیس شامل متورم شدن سلول (Swelling)، تجزیه (Lysis) و نشت محتویات سلولی است (Pennell, 1997; Cohen, 1993).

برخی از فلزات نقش مهمی را در متابولیسم و رشد سلولهای زنده ایفا می کنند. در واقع آنها گروه پروستتیک و کوفاکتور بسیاری از آنزیمها و پروتئینها هستند (Bert *et al.*, 1972). کادمیوم (Cd^{2+}) یکی از آلاینده های محیطی و صنعتی است که در حال حاضر اطلاعات کمی در مورد اعمال مفید آن در دسترس می باشد (Habeebu *et al.*, 1998). کادمیوم به انواع سلولها، گیاهی یا جانوری، آسیب می رساند.

مطالعات مختلف نشان می دهد که کادمیوم از طریق تولید رادیکالهای آزاد در القای PCD نقش دارد. به این ترتیب فلز نامبرده در گیاهان باعث پیری زودرس (Premature Senescence) می گردد (Takashi *et al.*, 1987; Stewart-Pinkham, 1990).

عنصر فوق برای کلروپلاست و میتوکندری بسیار سمی بوده و باعث کاهش شدت فتوسنتز و افزایش تنفس نوری می گردد (Lamoreaux *et al.*, 1978). بخشی از کارهایی که تاکنون بر روی زعفران انجام شده شامل بررسی رنگیزه های کاروتنوئیدی زعفران در گیاه کامل و در کشت بافت (رجبیان، ۱۳۷۱)، بررسی تغییرات کمی و کیفی مریستم انتهایی ساقه زعفران مزروعی طی دوره رویش (ابریشم چی، ۷۴-۱۳۷۳) و کینتیک ایزوپراکسیدازها و حساسیت آنها نسبت به مهارکننده ها در بنه زعفران (Keyhani *et al.*, 2000) می باشد.

هدف از انجام این تحقیق مطالعه رشد ریشه ها و بررسی میکروسکوپی سلولهای ریشه زعفران تحت تاثیر فلز کادمیوم می باشد.

مواد و روشها

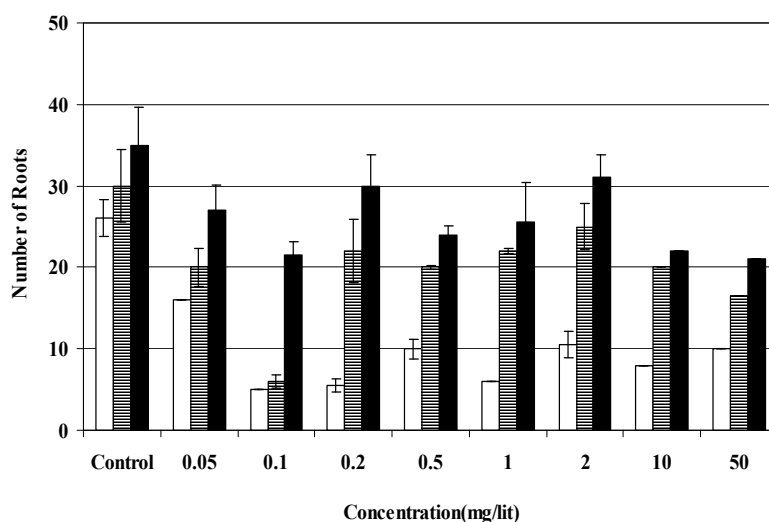
با توجه به اینکه ریشه دهی در زعفران فصلی می باشد، بنه های (Corms) زعفران در آب مقطر به عنوان شاهد و در غلظتهای مختلف سولفات کادمیوم ($CdSO_4$) ۰/۵، ۰/۲، ۰/۱، ۰/۰۵ mg/l در زمان مناسب آن یعنی از اوایل مهرماه تا اواخر آذرماه قرار داده شدند. لازم به ذکر است که آب مقطر به عنوان تیمار شاهد در نظر گرفته شد. اندازه گیری رشد طولی ریشه ها و تعداد آنها در ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از شروع تحقیقات انجام گرفت. پس از آن ریشه های مربوط به غلظتهای ۰/۵، ۰/۲، ۰/۱ و ۰/۰۵ mg/l کادمیوم و محلول شاهد جدا شده و همگی با محلول گلو تار آلدئید ۳٪ تثبیت شدند. پس از آن براساس تکنیکهای کلاسیک سیتولوژیکی، مراحل مختلف آگیری با الکل اتیلیک، سپس قرار گرفتن در مخلوط الکل اتیلیک و تولوئن و سرانجام قالب گیری در پارافین با درجه ذوب 53° بعمل آمد. قالبها با میکروتوم Leitz به ضخامت ۶ میکرون برش گیری شدند. پس از انتقال برشها بر روی لامهای شیشه ای و پارافین زدایی، آنها را ابتدا با رنگ دندانۀ آلن دوفر ۵٪ و سپس با

هماتوکسیلین به روش Regaud به مدت ۲۴ ساعت رنگ آمیزی نمودیم. پس از تمایز دادن رنگها در آلن دوفر ۲٪، لامها توسط اینتالن مونتاز شدند (Behboodi, 1974). بعد از خشک شدن لامها توسط میکروسکوپ ZEISSIII مشاهده و عکسبرداری بعمل آمد. محاسبه ابعاد سلولی با کالیبره کردن میکروسکوپ و عکسهای استاندارد 7×10 سانتیمتر توسط کولیس به انجام رسید. نرم افزار Excel 97 جهت سنجش میانگین ها و محاسبه انحراف معیار مورد استفاده قرار گرفت.

نتایج

۱- اثر کادمیوم بر روی تعداد و رشد طولی ریشه‌ها:

نمودار ۱ بر اساس تعداد ریشه‌های خارج شده از پیاز زعفران در غلظت‌های مختلف کادمیوم ترسیم گردیده است. همانطور که در این نمودار مشاهده می‌شود، در محلول شاهد تعداد ریشه‌های خارج شده از پیاز زعفران به صورت تدریجی و منظم است.



نمودار ۱- اثر غلظت‌های مختلف کادمیوم بر تعداد ریشه‌های زعفران.

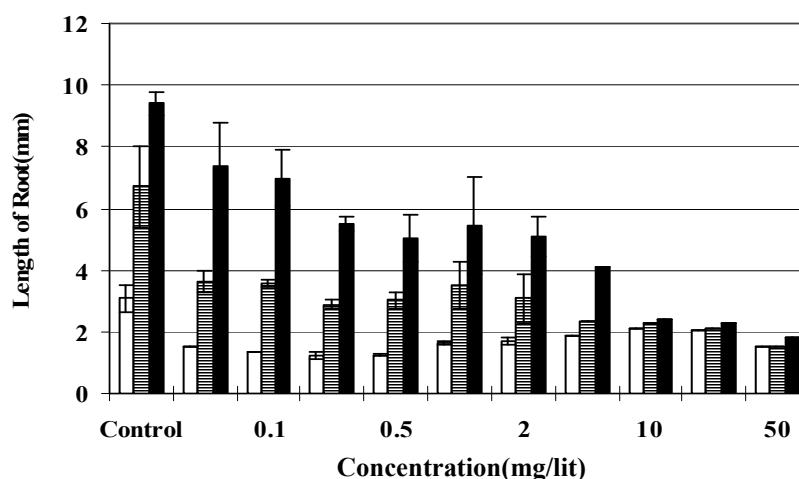
□: ریشه های خارج شده از پیاز زعفران در روز اول . ریشه های خارج شده از پیاز زعفران در روز دوم.
 ■: ریشه های خارج شده از پیاز زعفران در روز سوم. ریشه های شمارش شده در هر روز و در هر غلظت مربوط به ۵ پیاز زعفران می باشند.

به طوریکه در روز اول حدود ۲۶ عدد (۷۴٪ نسبت به روز سوم)، روز دوم حدود ۳۰ عدد (۸۵٪ نسبت به روز سوم) و روز سوم ۳۵ عدد ریشه از پیاز شاهد خارج شدند اما در غلظت‌های

بین ۰/۰۵-۲ mg/l کادمیوم در روز اول تعداد ریشه‌های خارج شده از هر پیاز زعفران حدود ۶۰٪-۲۰٪ تعداد ریشه‌ها نسبت به محلول شاهد می‌باشد. اما در روزهای دوم و سوم نزدیک به شاهد می‌باشد.

در غلظت‌های بالاتر از ۲ mg/l نیز در روز اول تعداد ریشه‌های خارج شده به حدود ۳۷٪ روز مشابه در محلول شاهد می‌رسد. در حالیکه در روز دوم و سوم تقریباً تعداد ریشه‌ها نزدیک به تعداد ریشه‌های شاهد در روزهای دوم و سوم می‌باشد.

در مورد رشد طولی ریشه‌ها وضعیت به صورت دیگری است. نمودار ۲ بر اساس رشد طولی ریشه‌ها در غلظت‌های مختلف کادمیوم رسم شده است.



نمودار ۲- اثر غلظت‌های مختلف کادمیوم بر طول ریشه‌های زعفران.

□: رشد طولی ریشه‌های زعفران در روز اول. ▨: رشد طولی ریشه‌های زعفران در روز دوم. ■: رشد طولی ریشه‌های زعفران در روز سوم. محاسبه رشد طولی ریشه‌ها در هر روز و در هر غلظت مربوط به ۵ پیاز زعفران می‌باشند.

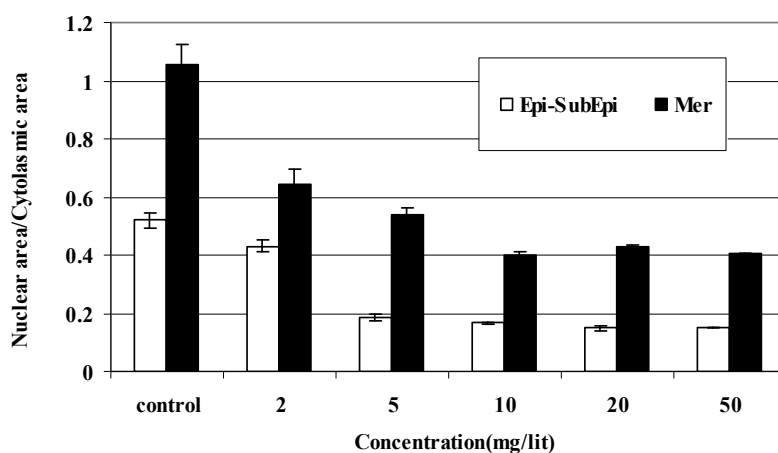
همانطوریکه در نمودار فوق ملاحظه می‌گردد در محلول شاهد طول ریشه در روز اول حدود ۳mm، روز دوم نزدیک به ۷mm و در روز سوم بیش از ۹mm می‌باشد. از این‌رو افزایش طول ریشه‌ها در این سه روز، تدریجی و منظم گزارش می‌گردد. اما با بکار بردن غلظت‌های مختلف کادمیوم تفاوت‌های زیادی نسبت به محلول شاهد آشکار می‌گردد. در تمام غلظت‌ها در روز اول کاهش رشد نسبت به نمونه شاهد دیده می‌شود. در روز دوم این کاهش در تمام غلظت‌ها بخصوص در غلظت‌های ۱۰، ۲۰ و ۵۰ نسبت به شاهد محسوس‌تر به نظر می‌رسد. در روز

سوم هیچگونه رشدی در ریشه‌هایی که در غلظت ۱۰ mg/l به بالا بوده‌اند دیده نمی‌شود. یعنی اندازه ریشه در آنها در روز اول و روز سوم تقریباً یکسان است و می‌توان گفت که رشد ریشه‌ها متوقف شده است.

۲- محاسبه نسبت هسته به سیتوپلاسم

در این تحقیق از بررسی نسبت سطح سیتوپلاسم/ سطح هسته ($\frac{Nuclear\ area}{Cytoplasmic\ area}$) به عنوان معیاری برای فعالیت و تقسیم سلول استفاده کردیم. نسبت فوق به صورت سطح هسته-سطح سلول/سطح هسته محاسبه می‌گردد. به طوریکه هرچه میزان آن بالاتر باشد، سلول فوق فعالتر است و آمادگی تقسیم بیشتری دارد. از این رو از معیار فوق در بررسی اثر فلزات استفاده کردیم.

بطوریکه در نمودار ۳ ملاحظه می‌شود، نسبت فوق در منطقه مریستمی در محلول شاهد بیش از یک می‌باشد. بدین معنی که سطح هسته تقریباً برابر با سطح سیتوپلاسم بوده و در



نمودار ۳ - بررسی نسبت سطح سیتوپلاسم/سطح هسته در منطقه مریستم $\blacksquare$ و اپیدرم $\square$ زیراپیدرم $\square$ برحسب غلظتهای مختلف کادمیوم. محاسبه نسبت فوق در تعدادی بالغ بر ۱۰۰۰ - ۵۰۰ سلول میباشد.

نتیجه این نسبت حدوداً یک گزارش می‌شود. اما در اپیدرم و زیراپیدرم ریشه این میزان حدود ۰/۵ می‌باشد. نمودار فوق نشان می‌دهد با توجه به افت شدید نسبت سطح سیتوپلاسم/ سطح

هسته در غلظت 2 mg/l کادمیوم و بالاتر از آن در منطقه مریستمی، این ناحیه از حساسیت بالایی برخوردار است. در حالیکه نسبت سطح سیتوپلاسم/سطح هسته در اپیدرم و زیراپیدرم نسبت به شاهد کاهش نسبتاً کمی را در غلظت 2 mg/l کادمیوم نشان می‌دهد. در غلظت 2 mg/l این نسبت در منطقه فوق افت شدیدی می‌یابد و به زیر 0.2 می‌رسد و پس از آن در غلظتهای بالاتر این نسبت تقریباً عدد ثابتی را نشان می‌دهد.

امکان اندازه‌گیری نسبت سطح سیتوپلاسم/سطح هسته در منطقه کلاهی به دلیل چندوجهی بودن سلولها و نامنظم بودن سلولهای در حال مرگ و در منطقه استوانه مرکزی به دلیل مشخص نبودن مرز دقیق هسته و چروکیدگی شدید سیتوپلاسم امکان‌پذیر نبود (شکل ۱ و ۲ پلیت ۲).

۳- نتایج میکروسکوپی

ریشه شاهد:

شکل ۱ پلیت ۱: در این شکل شمای کلی بخشهای مختلف ریشه زعفران دیده می‌شود. همانطور که در شکل ملاحظه می‌گردد، سلولهای کلاهی (C) نقش حفاظت از مریستم انتهایی ریشه را دارند. سلولهای مریستمی (M) که در قسمت عقب کلاهی وجود دارد از مراحل جنینی به بعد با تقسیمات پی‌درپی در بوجود آوردن بخشهای دیگر ریشه نقش دارد. سلولهای اپیدرم (Ep) خارجی‌ترین لایه‌های جانبی ریشه را تشکیل می‌دهد. سلولهای لایه زیر اپیدرم (Se) نسبت به سلولهای اپیدرم در بخش داخلی‌تر ریشه قرار دارند.

شکل ۲ پلیت ۱: مطالعات نشان می‌دهد که سلولهای کلاهی (C) به طور طبیعی در اثر مرگ از بین می‌روند (Pennell, 1997). این سلولها توسط مریستم انتهایی ریشه از منطقه Caliptra منشأ می‌گیرند و به تدریج تمایز می‌یابند. همانطور که در این شکل ملاحظه می‌گردد، هرچه از مریستم به سمت نوک کلاهی پیش می‌رویم، سلولها حالت چندوجهی پیدا کرده و دیگر شکل مشخصی ندارند. همچنین واکوئلی شدن در آنها به تدریج بیشتر شده و هستکها کوچکتر می‌گردند.

شکل ۳ پلیت ۱: منطقه مریستمی سلولهای ریشه شاهد دیده می‌شود. در مریستم شکل سلولها هم قطر (Isodiametric) بوده و نسبت سطح سیتوپلاسم/سطح هسته آنها بیش از یک می‌باشد (نمودار ۳). در این بخش از ریشه سلولهای در حال تقسیم، فراوان دیده می‌شود. همچنین سلولها دارای هستکهای بسیار درشتی هستند.

شکل ۴ پلیت ۱: با توجه به مشاهدات انجام شده مشخص شده است که سلولهای اپیدرم نیز به تدریج به طرف مرگ پیش می‌روند. سلولهای اپیدرم (Ep) در هنگام جدا شدن، دارای سیتوپلاسم چروکیده هستند. سلولهای لایه زیراپیدرم (Se) به منظور جبران سلولهای اپیدرمی جدا شده، در اثر تقسیمات میتوزی این کمبود را جبران می‌نمایند. لایه زیراپیدرم معمولاً دارای سلولهای چهار وجهی می‌باشند که تقسیم میتوز در بعضی از سلولها مشاهده می‌گردد.

ریشه‌های تیمار:

مطالعه کلاهک در غلظتهای مختلف تیمار نشان می‌دهد که تغییرات شدید مورفولوژیک سلولها در این ناحیه از غلظت ۵ mg/l آغاز می‌گردد.

شکل ۱ پلیت ۲: مربوط به کلاهک ریشه زعفران در غلظت ۲۰ mg/l کادمیوم است. در این غلظت بیش از ۹۰٪ سلولها از بین رفته‌اند و علائمی نظیر قطعه‌قطعه شدن و فشردگی هسته‌ها به وضوح دیده می‌شود. همچنین چروکیدگی سیتوپلاسم نیز به چشم می‌خورد.

شکل ۲ پلیت ۲: در این شکل، کلاهک ریشه زعفران که با کادمیوم ۱۰ mg/l تیمار شده است، دیده می‌شود. و تنها تشکیل واکوئل‌های بزرگ، فشردگی هسته‌ها و به کنار رانده شدن آنها نمایان است. شکل ۳ پلیت ۲: این شکل مربوط به سلولهای مریستمی تیمار شده با غلظت ۲ mg/l کادمیوم است. با توجه به اندازه‌گیریهای انجام شده و آنچه که در نمودار ۳ به نمایش گذاشته شده است مشخص می‌شود که سلولهای مریستمی در این غلظت با تغییراتی که در سیتوپلاسم ایجاد کرده‌اند، اثر این استرس را تا حد زیادی به حالت اعتدال درآورده‌اند. از اینرو در این غلظت با افت شدید نسبت سطح سیتوپلاسم/سطح هسته (نمودار ۳) مواجه هستیم. تغییرات هسته در این غلظت در سلولهای مریستمی کم‌کم در حال آغاز شدن است.

شکل ۴ پلیت ۲: در غلظت ۵ mg/l علاوه بر فشردگی شدید هسته‌ها و به کنار رانده شدن آنها، فشردگی سیتوپلاسم نیز در سلولهای مریستمی دیده می‌شود. این فشردگی سیتوپلاسم به حدی است که نسبت سطح سیتوپلاسم/سطح هسته در مقایسه با سلولهای مریستمی محلول شاهد تقریباً به نصف می‌رسد.

مطالعه اپیدرم و زیراپیدرم در تیمارها:

براساس اندازه‌گیریهای انجام شده در نمودار ۳ افت شدید نسبت سطح سیتوپلاسم/سطح هسته از غلظت ۵ mg/l آغاز شده، بطوریکه از این غلظت به بالاتر تقریباً نسبت فوق عدد ثابتی را نشان می‌دهد.

شکل ۱ پلیت ۳: سلولهای اپیدرم (Ep) و زیراپیدرم (Se) ریشه زعفران که با کادمیوم ۵ mg/l تیمار شده است را نشان می‌دهد. در این غلظت در حدود ۵۰٪ سلولها، فشردگی شدید هسته

به چشم می‌خورد. همین امر باعث افت شدید نسبت سطح سیتوپلاسم/سطح هسته شده است. البته تعداد سلولهای سالم در این غلظت حدود ۵۰٪ سلولهای در حال مرگ می‌باشند. شکل ۲ پلیت ۳: سلولهای اپیدرم و زیراپیدرم را در غلظت ۲۰ mg/l نشان می‌دهد. در این غلظت اثر فلز به قدری است که منجر به تجزیه شدن سلول‌ها و بیرون افتادن هسته‌ها می‌گردد. به عبارت دیگر به نقطه پایانی هومئوستازی سلول یعنی نکروزیس می‌رسیم. استوانه مرکزی (Central Cylinder):

این ناحیه بخش مرکزی ریشه را اشغال می‌نماید. این بخش توسط ناحیه زیراپیدرم (سلولهای آندودرمی) محدود می‌گردد.

شکل ۳ پلیت ۳: ناحیه مذکور در محلول شاهد دارای سلولهای منظم به همراه هسته‌های مشخص و هستکهای درشت می‌باشد. شکل سلولها در این ناحیه به صورت مکعبی شکل می‌باشد. همچنین در سیتوپلاسم سلولهای ناحیه استوانه مرکزی، واکوئل‌های ریز دیده می‌شود. شکل ۴ پلیت ۳: در غلظت ۲ mg/l کادمیوم، همانطور که ملاحظه می‌گردد، در عین حال که ارتباط عادی بین سلولها حفظ شده است، هسته‌ها نیز به وضوح دیده می‌شوند و دارای هستکهای درشت و مشخص می‌باشند. سلولها نیز همان حالت مربعی شکل خود را دارند، اما در سیتوپلاسم آن تغییری که ملاحظه می‌گردد، به هم پیوستن واکوئل‌های کوچک و به وجود آمدن واکوئل بزرگتر و حجیم است.

شکل ۱ پلیت ۴: در تیمار ۵ mg/l کادمیوم، یعنی در شروع غلظت بحرانی چروکیده شدن سیتوپلاسم کم‌کم آغاز می‌گردد. سلولها کم‌وبیش شکل مربعی خود را از دست داده‌اند. در این غلظت بعضی از هسته‌ها حالت نرمال و عادی خود را دارند و بعضی حالت فشرده شدن را به خود گرفته‌اند. مع الوصف تشکیل واکوئل بزرگ باعث به کنار کشیده شدن هسته‌ها به گوشه سیتوپلاسم شده است. در این غلظت هنوز به نظر می‌رسد که روابط سلولی منظم می‌باشند. سیتوپلاسم بعضی از سلولها حالت دانه‌دانه دارد و چروکیدگی سیتوپلاسم کم‌کم در این غلظت آغاز می‌گردد.

شکل ۲ پلیت ۴: تیمار ۱۰ mg/l کادمیوم نشان می‌دهد که سیتوپلاسم سلولهای منطقه استوانه مرکزی بصورت چروکیده درآمده و از دیواره سلول جدا شده است. چروکیدگی سیتوپلاسم کم‌کم در این غلظت آغاز می‌گردد. هسته‌ها اکثراً فشرده شده و در عین حال کناری شدن آنها بسیار واضح است.

شکل ۳ پللیت ۴: در غلظت ۲۰ mg/l کادمیوم نشان داده شده است که چروکیدگی سیتوپلاسم تقریباً در تمامی سلولهای منطقه استوانه مرکزی دیده می شود. هسته ها نیز به صورت حاشیه ای و فشرده وجود دارد.

شکل ۴ پللیت ۴: در غلظت ۵۰ mg/l کادمیوم فروپاشی سیتوپلاسم به وضوح دیده می شود، یعنی در نقطه پایانی هومئوستازی سلول قرار داریم.

بحث

براساس بررسیهای انجام شده اینطور به نظر می رسد که در محلول شاهد، اکثر ریشه ها در همان روز اول از پیاز زعفران خارج شده اند (۷۴٪). در روز دوم تنها ۱۱٪ نسبت به روز اول افزایش داشته است. در حالیکه در غلظتهای مختلف کادمیوم تعداد ریشه های خارج شده در روز اول حدود ۲۰٪ - ۶۰٪ محلول شاهد می باشد، اما در روزهای دوم و سوم تعداد ریشه ها به نزدیک تعداد ریشه های شاهد رسیده است.

با توجه به این نتایج می توان گفت که فاکتور ریشه دهی در روز اول بیشتر تحت تأثیر غلظتهای مختلف کادمیوم قرار گرفته است. با توجه باین نتایج می توان گفت در حالیکه در روز دوم فاکتور فوق در مقابل تیمارهای مختلف خود را سازگار کرده است. این مسأله می تواند بیان کننده یک مکانیسم سازگاری (Adaptation) در مقابل استرس کادمیوم باشد.

در مورد رشد طولی ریشه ها در یک زمان مشخص ثابت شد که کاهش رشد یکی از مهمترین اثرات کادمیوم می باشد، به طوریکه در گیاهان سمیت کادمیوم در بالای غلظت بحرانی در ریشه آشکار می گردد. همانطور که در نمودار ۲ ملاحظه می گردد، در زعفران غلظت بحرانی کادمیوم حدود ۵ mg/l تخمین زده می شود. در حالیکه اثر سمی این فلز در زیر غلظت بحرانی تفاوت رشد قابل توجهی را ایجاد نمی کند. به عبارت دیگر فعالیت منطقه مریستمی در ریشه ها طوری عمل می کند که سمیت کادمیوم را در زیر این غلظت بی اثر می نماید. این نتیجه ما با تحقیق (Pandolfini et al., 1992) در مورد ریشه گیاه *Triticum aestivum* L. منطبق می باشد.

توقف و یا کاهش شدید رشد طولی ریشه، به چند دلیل میتواند باشد:

۱- مرگ سلولی، ۲- از بین رفتن فشار تورگر که برای رشد سلولی لازم می باشد و ۳- عدم طویل شدن سلولها در منطقه رشد طولی یا Elongation (Katsuhara, 1992).

بررسیهای مورفولوژیک و استخراج DNA سلولهای مریستمی که تحت تأثیر استرس نمک قرار گرفته بودند نشان داد که مرگ سلولهای مریستمی عامل اصلی توقف رشد می باشد

(Katsuhara, 1992). اگر چه از بین رفتن فشار تورگور نیز می‌تواند به عنوان عامل کاهش رشد در غلظت‌های پایین در نظر گرفته شود. عدم طویل شدن سلولها در منطقه رشد طولی ریشه هنوز ناشناخته است.

براساس نمودار ۳ و مشاهدات میکروسکوپی مشخص می‌شود که منطقه مریستم و کلاهک حساسیت بیشتری نسبت به کادمیوم دارند. اما حساسیت این دو منطقه با هم تفاوت‌های زیادی دارد. بطوریکه در منطقه مریستمی حتی در زیر غلظت بحرانی، تغییرات مهم سیتولوژیکی از جمله بزرگ شدن سطح سیتوپلاسم آغاز می‌گردد. این تغییر مهم به خصوص در نمودار ۳ مشهود است. اما در کلاهک تغییرات مورفولوژیکی از همان غلظت ۲ mg/l یعنی در زیر غلظت بحرانی آغاز می‌شود.

از طرفی با توجه به اینکه سلولهای کلاهک به طور طبیعی دچار مرگ می‌شوند، حضور استرس‌های مختلف از جمله کادمیوم در تحقیق ما باعث تسریع مرگ سلولی و گسترده شدن آن در بخشهای مختلف کلاهک می‌گردد. همچنین نشان داده شد که کلاهک نسبت به سایر بخشهای ریشه علائم مربوط به مرگ سلولی را در همه غلظتها سریعتر نشان می‌دهد.

در مورد منطقه اپیدرم-زیراپیدرم مشخص شد که نسبت به مریستم مقاوم‌تر است و حساسیت کمتری دارد. در مورد منطقه استوانه مرکزی نیز در غلظتهای بالای ۵ mg/l تغییرات شدید مورفولوژیک مشاهده می‌شود.

بر این اساس است که گفته می‌شود تغییرات بخشهای مختلف در هر غلظت کاملاً وابسته به ساختار و وضعیت فیزیوشیمیایی سلولها دارد و عامل استرس‌زا، اثرات متفاوتی را بر جای خواهد گذاشت. این نتایج برای اولین بار در این مقاله گزارش می‌شود.

هنوز مسیر پیام‌رسانی مربوط به فلزات سنگین در گیاهان عالی شناخته شده نیست (Xiang *et al.*, 1998)، اما مشخص شده است که کادمیوم در متابولیسم Ca^{2+} درون سلول اثر می‌گذارد (Habeebu *et al.*, 1998)، بطوریکه در حضور Ca^{2+} آندونوکلئازهای وابسته به یون کلسیم فعال شده و باعث قطعه‌قطعه شدن DNA می‌گردد. با توجه به این شواهد پیشنهاد می‌گردد مکانیسم سلولی مشابه مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده سلولهای جانوری در سلولهای گیاهی نیز وجود دارد.

زیرنویس پلیت‌ها

پلیت ۱: تمام ریشه با گلو تار آلدئید ۳٪ تثبیت شده و با همتوکسیلین رنگ آمیزی شدند.

شکل ۱: بخشهای مختلف ریشه زعفران.

M: مریستم C: کلاهک Ep: اپیدرم Se: زیراپیدرم

شکل ۲: سلولهای کلاهک از منطقه زیرین مریستم سرچشمه می‌گیرند

(←) M: مریستم C: کلاهک

شکل ۳: منطقه مریستمی در انتهای ریشه. حد فاصل مریستم و کلاهک در شکل مشخص

است (←). تقسیم سلول مریستمی در مرحله متافاز نشان داده می‌شود. (←)

شکل ۴: تقسیم سلولی در لایه سلولهای زیرپوست نشان داده می‌شود.

(←) جدا شدن لایه‌های خارجی اپیدرم نیز دیده می‌شود (←)

Ep: اپیدرم Se: زیراپیدرم

پلیت ۲: تمام ریشه‌های این قسمت توسط گلو تار آلدئید ۳٪ تثبیت و با همتوکسیلین رنگ آمیزی شدند.

شکل ۱: مربوط به ریشه زعفران در غلظت ۲۰ mg/l کادمیوم است. در این قسمت کلاهک،

فشرده‌گی هسته و قطعه‌قطعه شدن آنها به چشم می‌خورد (←).

شکل ۲: در این شکل ریشه زعفران با غلظت ۱۰ mg/l کادمیوم تیمار شده است. واکنشهای

بسیار بزرگ و حجیم کلاهک باعث رانده شدن هسته به کنار دیوار شده است و فروپاشی

سیتوپلاسم نیز به وضوح دیده می‌شود (←).

شکل ۳: مربوط به ریشه زعفران در غلظت ۲ mg/l است. واکنشهای شدید در مریستم فوق

در مقایسه با مریستم شاهد (شکل ۴ پلیت ۱) نمایان است.

شکل ۴: در این شکل ریشه زعفران با کادمیوم ۵ mg/l تیمار شده است. در مریستم فوق،

فشرده‌گی شدید هسته‌ها و بعضاً به کنار کشیدن آنها نیز به چشم می‌خورد.

پلیت ۳: ریشه‌ها پس از تثبیت با گلو تار آلدئید ۳٪، با همتوکسیلین رنگ آمیزی شدند.

شکل ۱: منطقه اپیدرم (Ep) و زیراپیدرم (Se) ریشه زعفران که با کادمیوم ۵ mg/l تیمار شده

است را نشان می‌دهد. با وجود فشرده‌گی زیاد هسته در بعضی از سلولها، هنوز سیتوپلاسم ثبات

خود را حفظ کرده است (←).

شکل ۲: در این شکل ریشه زعفران با کادمیوم ۲۰ mg/l تیمار شده است. همانطور که ملاحظه

می‌شود اپیدرم (Ep) و زیراپیدرم (Se) در این غلظت به طور کامل از بین رفته است. بطوریکه

علاوه بر فشرده‌گی هسته‌ها فروپاشی سیتوپلاسم نیز به چشم می‌خورد.

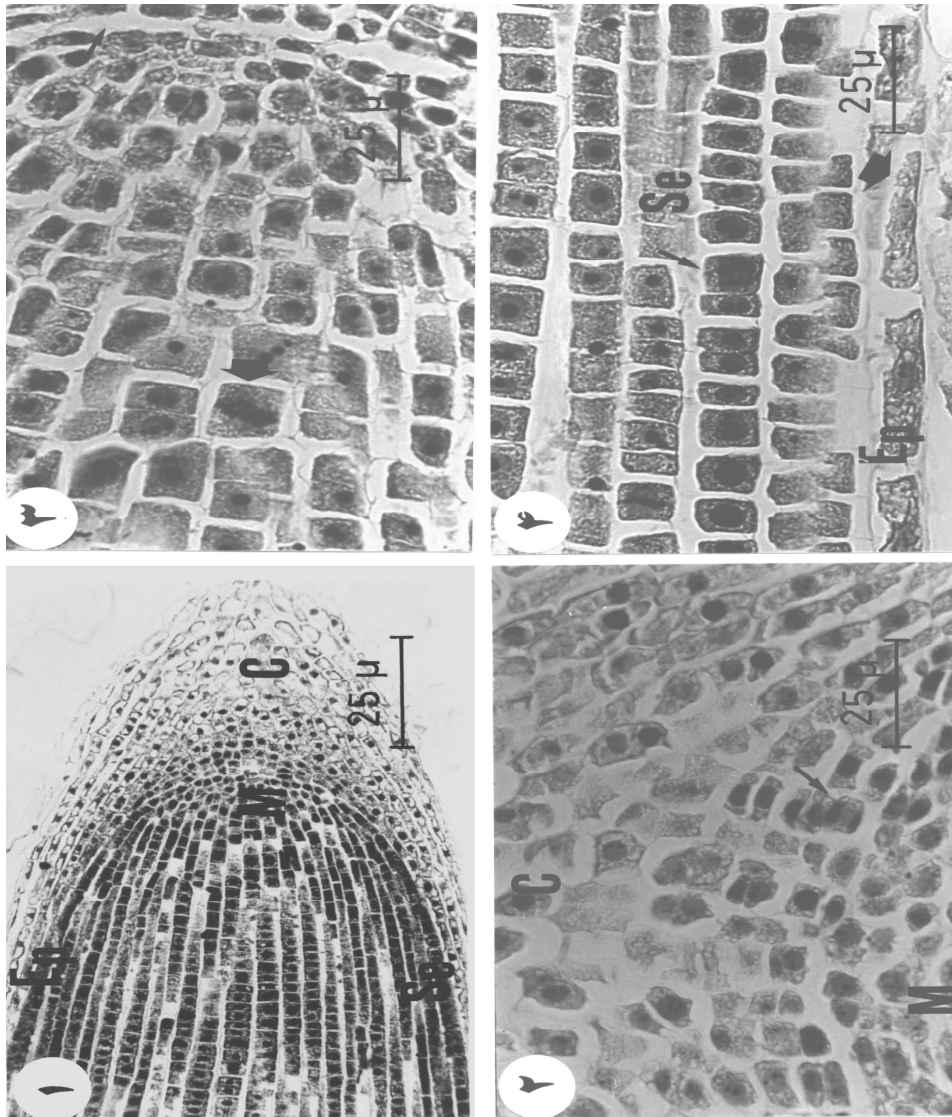
شکل ۳: استوانه مرکزی ریشه شاهد، وجود هسته‌های مشخص و هسته‌های درشت در این منطقه نمایان است. واکنش‌های کوچک نیز در سیتوپلاسم دیده می‌شود.

شکل ۴: استوانه مرکزی ریشه زعفران در تیمار کادمیوم 2 mg/l در برخی از سلولها در حالیکه هسته‌ها حالت عادی دارند اما در سیتوپلاسم، واکنش‌های بزرگتر از شاهد به چشم می‌خورد. پلیت ۴: ریشه‌ها پس از تثبیت با گلو تار آلدئید ۳٪ با همتوکسیلین رنگ آمیزی شدند.

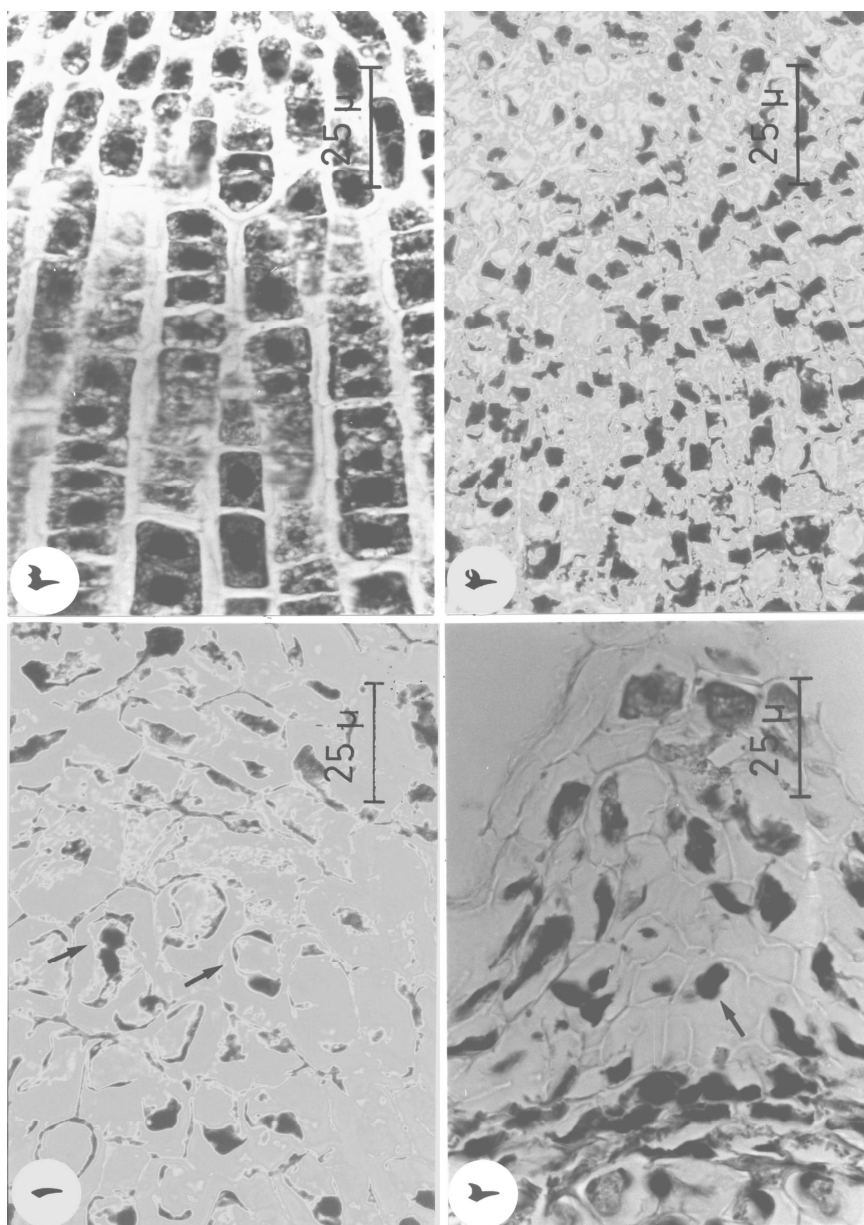
شکل ۱: استوانه مرکزی ریشه زعفران در تیمار کادمیوم 5 mg/l در عین حال که هسته بعضی از سلولها حالت عادی را نشان می‌دهد، بعضی از هسته‌ها حالت فشرده دارند. چروکیدگی سیتوپلاسم از این غلظت آغاز می‌گردد. شکل ۲: استوانه مرکزی ریشه زعفران در تیمار کادمیوم 10 mg/l چروکیدگی سیتوپلاسم در اکثر سلولها دیده می‌شود. هسته‌ها نیز اکثراً حالت حاشیه‌ای به خود گرفته‌اند.

شکل ۳: استوانه مرکزی ریشه زعفران در تیمار کادمیوم 20 mg/l چروکیدگی سیتوپلاسم به طور واضح نمایان است. هسته‌ها در عین فشرده شدن در کنار جداره سیتوپلاسم قرار گرفته‌اند. شکل ۴: استوانه مرکزی ریشه زعفران در تیمار کادمیوم 50 mg/l در این غلظت فروپاشی سیتوپلاسم دیده می‌شود. البته واکنش‌های سیتوپلاسم و فشرده شدن هسته‌ها نیز به چشم می‌خورد.

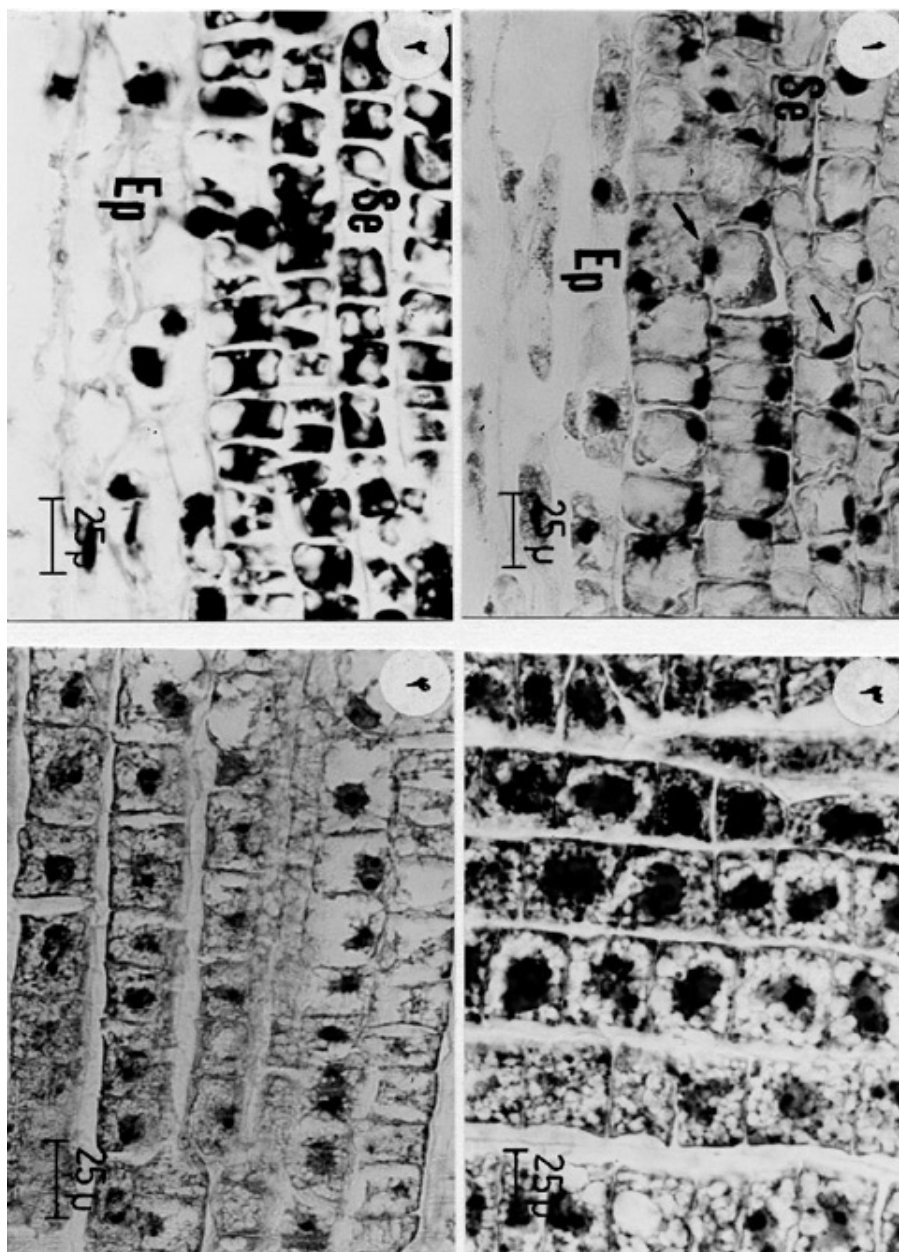
پلیت ۱- اشکال ۴-۱



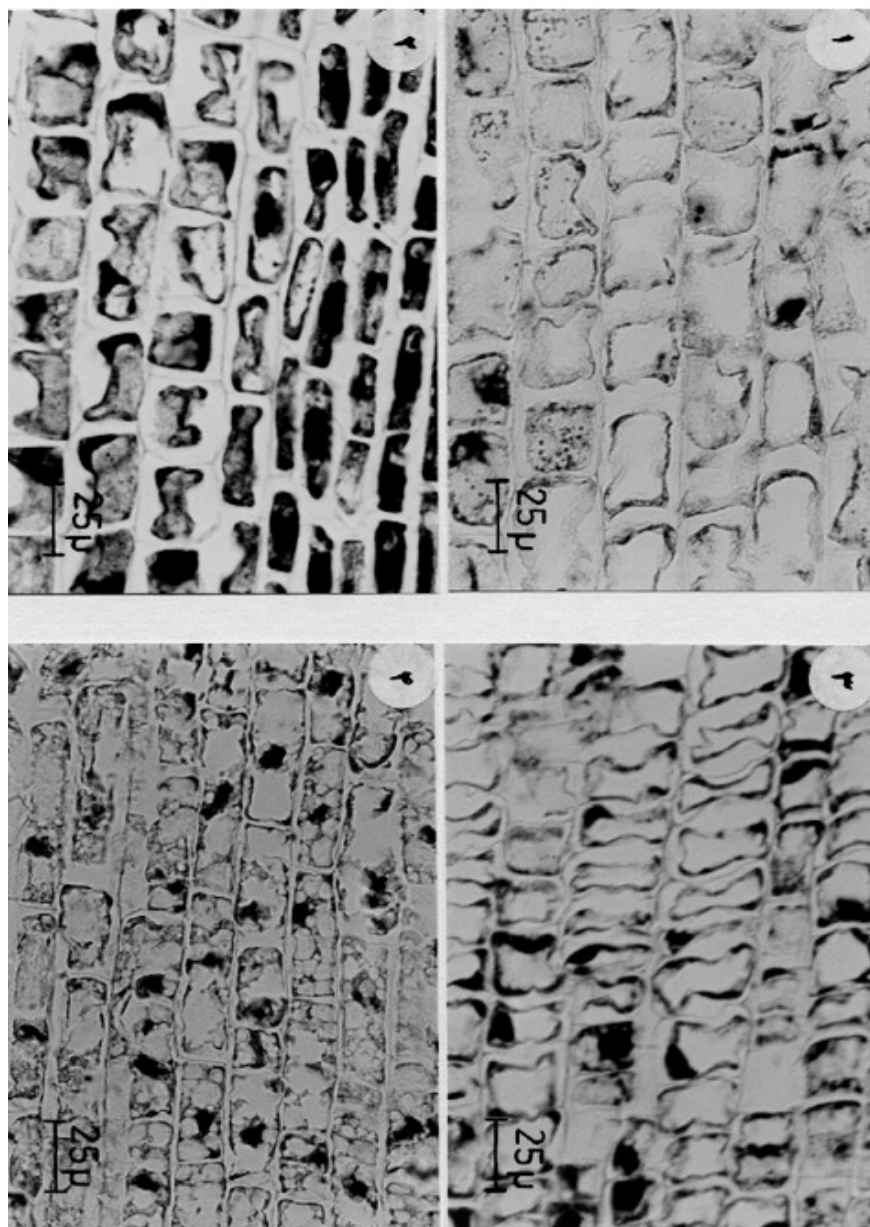
پلیت ۲- اشکال ۴-۱



پلیت ۳- اشکال ۴-۱



پلیت ۴- اشکال ۴-۱



References:

- Ahmad, S., (1995) *Oxidative stress and antioxidant defense in biology*. (ed by Sami Ahmad). *Antioxidant defense in plants and Fungi*, pp: 298-355.
- Behboodi, B., Sh., (1974) *Contribution a l' e'tude morphologique et cytologique de l' Armillaria mellea (VAHL.ex Fr.)*, Ph.D thesis of Faculty of Science (PARIS VI)
- Bert, L., Ulmer V.D., Ulmer D.D., (1972) *Biochemical effects of Mercury, Cadmium and Lead*. *Ann. Rev. Biochem.*, **41**, 91-128.
- Cohen, J.J., (1993) *Apoptosis, Immunology Today*, **14**, 126-130.
- Frade, J.M. and Michaelidis, T.M. (1997) *Origin of eukariotic programmed cell death: A consequence of aerobic metabolism?*. *BioEssays*, **19**, 827-832.
- Greenberg, J.T., (1996) *Programmed cell death: A way of life for plants*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 12094-12097.
- Greenspan, H.C., and Aruoma, O.I., (1994) *Oxidative stress and apoptosis in HIV infection: a role for plant-derived metabolites with synergistic antioxidant activity*, *Immunology Today*, **15**, 209-213.
- Habeebu, S.S.M., Liu, J., and Klassen, C.D., (1998) *Cadmium induced apoptosis in mouse liver*. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **149**, 203-209.
- Halliwell, B., and Gutteridge, J.M.C., (1990) *Oxygen radicals in biological system., part B: Oxygen radicals and antioxidants*. (ed. By L. Packer and A.N. Glazer), 186, 1-85.
- Hengartner, M.O., and Bryant, J.A., (2000) *Praogrammed cell death in animals and plants*. (ed. By J.A. Bryant, S.G. Hughes and J.M. Garland), 2000 BIOS Scientific Publishers Ltd, Oxford, Chapter 1, pp: 1-12 .
- Katsuhara, M., and Kawasaki, T., (1996) *Salt stress induced nuclear and DNA degradation in meristematic cells of Barley roots*, *Plant.Cell Physiol.*, **37**, 169-173.
- Keyer, K., and Imlay, J.A., (1996) *Superoxide accelerate DNA damage by elevating free-iron levels*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 13635-13640.
- Keyhani, E., Veissizadeh, M. and Keyhani, J., (2000) *Kinetics of isoperoxidases and their differential sensitivity to inhibitors in Saffron (Crocus Sativus L.) bulb*, in *Biothermokinetics 2000, Animating the cellular Map*, J.H.S. Hofmeyr, J.M. Rohwer, J.L. Snoop (Eds) Stellenbosch university press, pp: 37-42.
- Lamoreaux, J.R. and Chaney, W.D. (1978) *The effects of cadmium on net photosynthesis, transpiration, and dark respiration of excised silver maple leaves.*, *Physiologia Plantarum*, **43**, 231-236.

- Pandolfini, T., Gabbrielli, R., and comparini, C., (1992) *Nickel toxicity and peroxidase activity in seedlings of Triticum aestivum L.* Plant. Cell Environ., 15, 719-725.
- Pennell, R.I. and lamb, C., (1997) *Programmed cell death in plants*, Plant Cell., 9, 1157-1168.
- Slater, A.F.G., Stefan, C., Nobel, I., Vanden Dobbelssteen, D.J., and Orrenius, S., (1995) *Signalling mechanisms and oxidative stress in apoptosis.*, Toxicol. Lett., 82/83, 149-153.
- Stewart - Pinkham, S.M. (1990) *Plants for toxicity assessment*, (ed. By J.W. Gorsuch, W.R. Lower and W.Wang) Second volume. 161-171.
- Takashi, K., Oschi, T. and ohsawa, M., (1987) *Indirect evidence for the induction of a prooxidant state by cadmium chloride in cultured mammalian cells and a possible mechanism for the induction.*, Mut. Res., **180**, 257-266.
- Xiang, C. and Oliver, D.J., (1998) *Glutathione metabolic genes coordinately Respond to heavy metals and Jasmonic acid in Arabidopsis.*, Plant cell, **10**, 1539-1550.

بهینا، م.، (۱۳۷۰) زراعت زعفران، انتشارات دانشگاه تهران، ۳۳-۳۵.

ابریشمچی، پ.، (۱۳۷۳-۷۴) بررسی تغییرات کمی و کیفی مریستم انتهایی ساقه زعفران مزروعی طی دوره رویش. پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشکده علوم دانشگاه تهران.

رجبیان، ط.، (۱۳۷۱) بررسی رنگیزه‌های کاروتنوئیدی زعفران در گیاه کامل و در کشت بافت. پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشکده علوم دانشگاه تهران.