

## اثر EMS در ایجاد مقاومت و تجمع کادمیوم در کالوس درختچه زیتنی طاووسی

محبوبه گنجی دستجردی<sup>۱</sup>، مینا تقی‌زاده<sup>۱\*</sup>، علی خدیوی<sup>۱</sup> و منصور قربانپور<sup>۲</sup>

<sup>۱</sup> گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه اراک، <sup>۲</sup> گروه گیاهان دارویی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی،

دانشگاه اراک

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۰۱/۱۵، تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹۷/۰۵/۱۵)

### چکیده

جهش‌زایی درون‌شیشه‌ای جهت گزینش گیاهان مقاوم به تنش مانند تنش فلزات سنگین بسیار به کار برده می‌شود. هدف این مطالعه گزینش کالوس‌های مقاوم به کادمیوم و القای جهش درون‌شیشه‌ای با استفاده از اتیل متان سولفونات، جهت افزایش مقاومت و پالایندگی کالوس درختچه زیتنی طاووسی به فلز کادمیوم بود. در ابتدا اثر غلظت‌های مختلف 2,4-D و BA القای کالوس در ریزنمونه گره‌ای بررسی شد. در آزمایش بعدی کالوس‌های انگیزش‌یافته در معرض غلظت‌های مختلف کادمیوم (صفر، ۱۰، ۲۰ و ۴۰ میلی‌گرم در لیتر) قرار گرفتند. در آزمایش نهایی کالوس‌ها با اتیل متان سولفونات ۰/۲٪ به مدت ۱۰ دقیقه تیمار شدند و سپس در محیط کشت صفر و ۱۰ میلی‌گرم در لیتر کادمیوم واکشت شدند. نتایج نشان داد که بیشترین میزان کالوس‌زایی و کمترین میزان قهوه‌ای شدن ریزنمونه در محیط کشت تکمیل شده با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D بود. با افزایش غلظت کادمیوم شاخص‌های رشدی و شاخص تحمل در کالوس کاهش اما میزان قهوه‌ای شدن کالوس افزایش یافت. در حضور کادمیوم غلظت متابولیت‌های ثانوی شامل فنل، فلاونوئید و فلاونول کل در مقایسه با شاهد افزایش پیدا کرد. همچنین با افزایش غلظت کادمیوم در محیط کشت، انباشت کادمیوم در کالوس افزایش یافت. بیشترین میزان تجمع کادمیوم ۷۹۱/۳۱ میلی‌گرم در کیلوگرم وزن خشک در غلظت ۴۰ میلی‌گرم در لیتر حاصل شد. رشد کالوس‌های تیمار شده با EMS کاهش یافت ولی فعالیت آنتی‌اکسیدان‌های غیر آنزیمی شامل فنل، فلاونوئید و فلاونول کل نسبت به شاهد افزایش یافت. اعمال EMS نتوانست میزان انباشتگی کادمیوم را در کالوس افزایش دهد ولی شاخص تحمل کالوس طاووسی را بهبود داد.

واژه‌های کلیدی: جهش‌زایی، فلز سنگین، کالوس، گیاهان زیتنی، گیاه‌پالایی

### مقدمه

می‌شود (Iori et al., 2012). یکی از اثرات نامطلوب کادمیوم در گیاهان تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) است که منجر به تنش اکسیداتیو می‌شود. گونه‌های فعال اکسیژن سبب تحریک آنزیم‌های سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی، اختلال در زنجیره انتقال الکترون و یا القای پراکسیداسیون لیپید می‌شوند (Benavides et al., 2005). گزارش شده است که کادمیوم

درسال‌های اخیر با توجه به افزایش فعالیت‌های صنعتی و کشاورزی فشرده رهایی فلزات سنگین در آب و خاک‌ها یک تهدید جدی برای زنجیره‌های غذایی و بقای اکوسیستم‌ها ایجاد کرده است. کادمیوم یک فلز غیر ضروری است که برای گیاهان بسیار سمی است و سبب جلوگیری از رشد و متعاقباً مرگ گیاه

تغییراتی در هر دو سیستم‌های آنتی‌اکسیدانی آنزیمی و غیرآنزیمی ایجاد می‌کند (Schutzendubel et al., 2002).

گیاه‌پالایی یک روش مقرون به صرفه و کم‌خطر جهت پاک‌سازی خاک‌های آلوده می‌باشد. به دلیل اینکه گیاهان زیتنی به‌عنوان غذا استفاده نمی‌شوند یک گزینه مناسب برای رشد در خاک‌های آلوده به فلزات سنگین در فضای سبز جهت گیاه‌پالایی پیشنهاد شده‌اند (Milusheva et al., 2015). در فضاهای سبز شهری استفاده از گیاهان زیتنی مقاوم به فلزات سنگین چشم‌انداز امیدوارکننده‌ای دارد. با این وجود گزارش‌ها مبنی بر شناسایی چنین گونه‌های زیتنی قابل کاربرد برای پالایش خاک‌های آلوده هنوز پراکنده است (Liu et al., 2008).

گیاه طاووسی با نام علمی *Spartium junceum* L. متعلق به تیره Fabaceae یک درختچه زیتنی-دارویی است که از نظر اقتصادی مهم‌ترین درختچه لگومیان، همیشه‌سبز، چندساله، دارای ۲-۴ متر ارتفاع، بومی نواحی مدیترانه در جنوب اروپا، جنوب شرق آسیا و شمال شرق آفریقا می‌باشد (Oggiano et al., 1997). این درختچه به غلظت‌های زیاد شوری در خاک مقاوم است. همچنین مقاوم به خشکی است و توانایی تثبیت نیتروژن را دارد و به‌عنوان یک گیاه تولیدکننده زیست‌توده گیاهی و منبع فیبر برای مواد کمپوستی مورد استفاده قرار می‌گیرد (Ilias and Travlos, 2009). این گونه به دلیل تولید متابولیت‌های ثانوی مانند آلکالوئیدها، ساپونین‌ها، فنل‌های ساده و فلاونوئیدها در دسته گیاهان دارویی توصیف شده است (Proestos et al., 2006). ترکیبات فنلی علاوه بر نقش‌های بسیار مهم متابولیکی در پاسخ به تنش‌های زنده و غیرزنده نیز نقش دارند و ممکن است تغییرات کمی و کیفی را در مدت تنش نشان دهند (Clematisa et al., 2014).

کشت درون‌شیشه‌ای یک ابزار ارزشمند جهت مطالعه، بهبود، آزمودن و گزینش مواد گیاهی کاندید جهت ایجاد مقاومت به تنش فلزات سنگین به‌ویژه در گونه‌های چوبی است که چرخه‌های تولیدمثلی طولانی دارند. کشت کالوس یک روش مناسب جهت ارزیابی فرایندهای تحمل و سم‌زدایی در گیاهان را ارائه می‌دهد (Confalonieri et al., 2003). بنابراین

تکنیک کشت درون‌شیشه‌ای اجازه می‌دهد که سلول‌ها به‌طور مستقیم در معرض عامل تنش در یک محیط کاملاً کنترل‌شده قرار بگیرند و اثرات سایر شرایط محیطی از بین رود. غربالگری درون‌شیشه‌ای نه تنها دوره رشد و طول زمان تیمار گیاهان را کاهش می‌دهد بلکه فضای مورد نیاز برای انجام آزمایش را نیز کاهش می‌دهد (Schutzendubel et al., 2002). جهش‌زایی یک روش بسیار مهم جهت تولید گیاهان با تغییرات ژنتیکی است که اجازه می‌دهد با جزئیات به ساز و کارهای مقاومت و حساسیت نسبت به انواع مختلف تنش پی ببریم. روش جهش‌زایی درون‌شیشه‌ای به‌وفور جهت گزینش گیاهان مقاوم به تنش به‌کار برده می‌شود (Piotto et al., 2014; Taghizadeh et al., 2015). اتیل متان سولفونات (Ethyl methane sulfonate)، یک ماده جهش‌زای شیمیایی از گروه آلکیل‌ات‌کننده‌ها است که به دلیل فراوانی زیاد جهش‌های ژنی و فراوانی کم ناهنجاری‌های کروموزومی به‌طور معمول در گیاهان مورد استفاده قرار می‌گیرد. این ماده جهش‌زا جهت تیمار کشت‌ها تحت شرایط درون‌شیشه‌ای در بسیاری از گونه‌ها مورد استفاده قرار گرفته است و جهش‌زایی کارآمد کشت سلولی گیاه را به دلیل تیمار یکنواخت سلول‌ها امکان‌پذیر کرده است (Arici et al., 2017; Nehnevajova et al., 2007; Luan et al., 2007; Taghizadeh et al., 2015). با توجه به اینکه کشت درون‌شیشه‌ای یکی از روش‌ها جهت ارزیابی گیاهان کاندید برای تکنولوژی گیاه‌پالایی است این مطالعه می‌تواند پتانسیل درختچه طاووسی را برای تحمل، انباشتگی و انتقال کادمیوم نشان دهد. بنابراین هدف این مطالعه بررسی اثر غلظت‌های مختلف کادمیوم بر صفات رشدی، شاخص تحمل، سطح انباشتگی کادمیوم، فاکتور تغلیظ زیستی، آنتی‌اکسیدان‌های غیرآنزیمی (شامل فنل، فلاونوئید و فلاونول کل) در طی کشت کالوس بود و پس از گزینش کالوس‌هایی که مقاومت حاصل پیدا کرده بودند القای جهش در شرایط درون‌شیشه‌ای با استفاده از ماده جهش‌زای EMS در کالوس، جهت گزینش کالوس با ویژگی افزایش مقاومت به کادمیوم و پالایندگی آن انجام گرفت. همچنین ساز و کار مقاومت و انباشتگی کادمیوم در طی

جهش‌زایی با EMS در طاووسی مورد بررسی قرار گرفت.

#### مواد و روش‌ها

**مواد گیاهی:** این آزمایش در آزمایشگاه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه اراک انجام گرفت. در این پژوهش شاخساره‌های نیمه‌خشبی از پایه‌های سه ساله درختچه طاووسی به‌عنوان مواد گیاهی برای کشت درون‌شیشه‌ای استفاده گردید. قطعات گره‌ای به طول ۱-۰/۵ سانتی‌متر به عنوان ریزنمونه استفاده گردید.

#### اثر نوع و غلظت‌های مختلف 2,4-D و BA در القای

**کالوس طاووسی:** در این آزمایش اثر غلظت‌های مختلف BA در ترکیب با غلظت‌های مختلف 2,4-D بر کالوس‌زایی ریزنمونه‌های گره‌ای طاووسی در محیط‌کشت MS بررسی شد. بدین منظور از سه غلظت BA (صفر، ۰/۱ و ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر) در ترکیب با چهار غلظت 2,4-D (صفر، ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر) استفاده گردید. ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر PVP (پلی‌وینیل پیرولیدین) جهت جلوگیری از قهوه‌ای شدن ریزنمونه‌ها ۳۰ گرم ساکارز و ۷ گرم بر لیتر آگار به محیط کشت اضافه گردید (براساس پیش‌تیمار جهت کنترل عارضه قهوه‌ای شدن). pH محیط‌کشت قبل از اتوکلاو کردن در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۲۰ دقیقه و فشار ۱/۲ اتمسفر روی ۵/۸ - ۵/۷ تنظیم شد. ریزنمونه‌های گره‌ای ضدعفونی شده (با اتانول ۷۰٪ به مدت ۳۰ ثانیه و ۱۰ دقیقه در محلول مایع سفیدکننده دارای ۵٪ ماده فعال با غلظت ۲۰٪) سپس به قطعات کوچکتر تقریباً ۰/۵ سانتی‌متری برش داده شدند و در محیط‌کشت القای کالوس کشت شدند. کشت‌ها در دمای ۱±۲۵ درجه سانتی‌گراد در تاریکی مطلق قرار داده شدند. این آزمایش در قالب فاکتوریل بر مبنای طرح کاملاً تصادفی انجام شد. مشاهدات به صورت هفتگی انجام شد و زمان انگیزش کالوس ثبت گردید. در پایان هفته چهارم درصد القای کالوس، میزان کالوس‌زایی، بافت و رنگ کالوس (مرفولوژی کالوس) و میزان قهوه‌ای شدن ریزنمونه نیز ثبت شدند. میزان قهوه‌ای شدن ریزنمونه و کالوس‌زایی ریزنمونه براساس درجه‌بندی که در

جدول ۱ اشاره شد ارزیابی گردید.

#### اثر غلظت‌های مختلف کادمیوم بر رشد کالوس:

کالوس‌های حاصل از واکشت دوم (۶ هفته‌ای) برای اعمال تیمار کادمیوم استفاده گردید. بدین منظور کالوس‌ها در زیر لامینار به قطعات تقریباً مساوی (۰/۵ سانتی‌متری) برش داده شده و به محیط‌کشت MS تکمیل شده با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر ایندول بوتریک اسید (IBA) و دو میلی‌گرم در لیتر (بنزیل آدنین) BA (بهترین شرایط تست شده برای رشد و استقرار کالوس) و نیترات کادمیوم در غلظت‌های صفر، ۱۰، ۲۰ و ۴۰ میلی‌گرم در لیتر واکشت شده و تحت شرایط محیطی که در بالا ذکر شد نگهداری شدند. این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار و هر تکرار نیز دارای چهار توده کالوس با اندازه یکسان انجام شد.

#### اثر جهش‌زایی EMS در کالوس بر میزان مقاومت و

**انباشت کادمیوم:** در آزمایش دوم ابتدا توده‌های کالوس انگیزش‌یافته در محیط‌کشت بدون کادمیوم به اندازه حدود ۰/۵ سانتی‌متر تحت تیمار ۰/۲٪ EMS به مدت ۱۰ دقیقه قرار گرفتند. از توده‌های کالوس بدون اعمال EMS نیز به‌عنوان شاهد استفاده شد. سپس این توده‌های تیمار شده در محیط‌کشت دارای ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA و دو میلی‌گرم در لیتر BA و ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر آنتی‌اکسیدان PVP و غلظت‌های ۱۰ و ۲۰ میلی‌گرم در لیتر نیترات کادمیوم (غلظت‌های تست شده در آزمایش اول که زنده‌مانی کالوس‌ها را در بر داشت) واکشت شدند. این آزمایش در قالب فاکتوریل بر مبنای طرح کاملاً تصادفی و با سه تکرار اجرا گردید. هر تکرار دارای شش توده کالوس بود.

#### اندازه‌گیری شاخص‌های رشد: پس از گذشت ۴۵ روز از

اعمال تیمار کادمیوم کالوس‌هایی که در ابتدا وزن شده بودند به پتری‌دیش‌های وزن شده انتقال یافته و مجدداً توزین شدند. با کم کردن وزن اولیه کالوس و وزن پتری‌دیش از وزن کل وزن تر کالوس در غلظت‌های مختلف کادمیوم محاسبه گردید. سپس کالوس‌ها به آون در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷۲ ساعت منتقل شدند و پس از خارج شدن از آون توزین

جدول ۱- درجه بندی کالوس از نظر میزان قهوه‌ای شدن و اندازه کالوس

| درجه بندی | میزان قهوه‌ای شدن کالوس | اندازه کالوس                     |
|-----------|-------------------------|----------------------------------|
| ۰         | عدم قهوه‌ای شدن         | عدم رشد                          |
| ۱         | کم                      | کم (قطر کالوس کمتر از ۰/۵ cm)    |
| ۲         | بین کم و متوسط          | بین کم و متوسط                   |
| ۳         | متوسط                   | متوسط (قطر کالوس بین ۰/۵ - ۱ cm) |
| ۴         | بین متوسط و زیاد        | بین متوسط و زیاد                 |
| ۵         | کاملاً قهوه‌ای          | زیاد (قطر کالوس بیشتر از ۱ cm)   |

شدند.

## اندازه‌گیری میزان متابولیت‌های ثانوی: جهت تهیه عصاره

میزان ۰/۳ گرم بافت کالوس با ۶ میلی‌لیتر متانول ۸۰٪ در حضور نیتروژن مایع سائیده شد. سپس به مدت ۳۰ دقیقه در دور ۴۲۰۰ rpm سانتریفیوژ گردید (Abeyasinghe *et al.*, 2014). از محلول شفاف رویی به‌عنوان عصاره در سنجش میزان فنل، فلاونوئید و فلاونول کل استفاده شد. میزان فنل کل با استفاده از روش Milusheva و همکاران (۲۰۱۵) اندازه‌گیری شد. مقدار ۵۰۰ میکرولیتر عصاره متانولی با ۲/۵ میلی‌لیتر محلول فولین سیوکالتیو مخلوط شدند. به مخلوط حاصل پس از دو دقیقه دو میلی‌لیتر محلول سدیم کربنات ۷٪ اضافه شد. پس از اینکه مخلوط حاصل به مدت ۶۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه و در تاریکی قرار گرفتند، جذب نمونه‌ها با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر در طول موج ۷۶۲ نانومتر خوانده شد. میزان فنل کل برحسب میلی‌گرم گالیک اسید در گرم وزن تر بافت بیان گردید. میزان فلاونوئید کل با استفاده از روش Abdel-Kadder و همکاران (۲۰۱۴) محاسبه شد. مقدار دو میلی‌لیتر محلول کلرید آلومینیوم ۲٪ با دو میلی‌لیتر عصاره متانولی ترکیب شدند. پس از گذشت ۶۰ دقیقه در دمای اتاق و تاریکی جذب نمونه‌ها با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر در طول موج ۴۲۰ نانومتر خوانده شد. میزان فلاونول کل با استفاده از روش Tahsili و همکاران (۲۰۱۳) براساس روش رنگ سنجی آلومینیوم کلرید محاسبه شد. مقدار یک میلی‌لیتر محلول کلرید آلومینیوم ۲٪ با یک میلی‌لیتر عصاره متانولی و سه میلی‌لیتر سدیم استات ۵٪ با هم ترکیب شدند. پس از گذشت ۱۵۰ دقیقه در دمای اتاق و شرایط تاریکی جذب نمونه‌ها در

میزان نسبی رشد کالوس در غلظت‌های مختلف طبق فرمول زیر محاسبه گردید:

$$\text{RGR (\%)} = (W_i - W_j) / W_j \times 100 \quad (\text{فرمول ۱})$$

$W_i$ : وزن نهایی کالوس پس از ۴۵ روز،  $W_j$ : وزن اولیه در زمان انتقال به محیط کشت دارای کادمیوم

جهت اندازه‌گیری میزان نسبی آب (RWC) از فرمول زیر استفاده گردید:

$$\text{RWC (\%)} = (FW - DW) \times 100 / FW \quad (\text{فرمول ۲})$$

$FW$ : وزن تر کالوس،  $DW$ : وزن خشک کالوس

میزان قهوه‌ای شدن و اندازه کالوس براساس درجه بندی (۰-۵) ارزیابی گردید (جدول ۱).

## اندازه‌گیری کادمیوم: پس از ۴۵ روز از واگشت کالوس‌ها،

کالوس‌های خشک‌شده به خوبی پودر شدند. اندازه‌گیری کادمیوم طبق روش Israr و همکاران (۲۰۰۶) با استفاده از دستگاه ICP-MS و در طول موج ۲۲۸/۸۰۲ نانومتر صورت گرفت. شاخص تحمل تنش (Ti) در کالوس با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید:

$$Ti = (DW_i / DW_j) \quad (\text{فرمول ۳})$$

$DW_i$ : میانگین وزن خشک کالوس در محیط دارای کادمیوم،  $DW_j$ : میانگین وزن خشک کالوس در محیط فاقد کادمیوم  
فاکتور تغلیظ زیستی (BCF) برای کادمیوم طبق فرمول زیر محاسبه شد:

$$\text{فرمول ۴}$$

غلظت کادمیوم در محیط کشت/غلظت کادمیوم در کالوس =  $BFC(\%)$

طول موج ۴۴۵ نانومتر خوانده شد. در نهایت میزان فلاونوئید و فلاونول کل بر حسب میلی گرم کوئرسیتین در گرم وزن تر بافت بیان گردید. آنالیز داده‌ها با استفاده از نرم افزار SAS صورت گرفت. آزمون چند دامنه‌ای دانکن (DMRT) برای مقایسه میانگین‌ها و تعیین معنی‌دار بودن تفاوت آماری در تیمارها در سطح احتمال پنج درصد استفاده گردید.

## نتایج و بحث

**اثر نوع و غلظت‌های مختلف 2,4-D و BA در القای کالوس طاووسی:** براساس جدول مقایسه میانگین‌ها اثر متقابل 2,4-D و BA بر کالوس‌زایی طاووسی نشان داد در تیماری که ۰/۵ میلی گرم در لیتر 2,4-D در محیط‌کشت به کار برده شده بود، انگیزش کالوس در طی ۲/۵ هفته اتفاق افتاد اما با کاربرد BA به همراه 2,4-D، زمان انگیزش نیز کاهش پیدا کرد. نتایج همچنین نشان داد به غیر از شاهد و کاربرد BA به تنهایی در محیط‌کشت که هیچ گونه کالوسی تشکیل ندادند در سایر تیمارها القای کالوس صورت گرفت. بنابراین کاربرد 2,4-D تا غلظت ۱ میلی گرم در لیتر اثر منفی بر درصد القای کالوس از ریزنمونه گره‌ای طاووسی در حضور و عدم حضور BA نداشت اما در غلظت ۲ میلی گرم در لیتر 2,4-D به تنهایی و در ترکیب با BA به طور معنی‌داری در مقایسه با سایر تیمارها کاهش یافت. با افزایش غلظت 2,4-D حجم کالوس کاهش پیدا کرد. نتایج همچنین نشان داد بیشترین میزان قهوه‌ای شدن در مقایسه با شاهد در تیمار دو میلی گرم در لیتر 2,4-D و ۰/۲ میلی گرم در لیتر BA بود و کمترین میزان قهوه‌ای شدن مربوط به کاربرد ۰/۵ میلی گرم در لیتر 2,4-D به تنهایی و در ترکیب با BA حاصل شد (جدول ۲).

**اثر غلظت‌های مختلف کادمیوم بر رشد کالوس:** بررسی ظاهری رشد کالوس‌ها پس از ۴۵ روز از اعمال تنش کادمیوم در محیط‌کشت نشان داد بیشترین میزان حجم کالوس با درجه ۴/۶۶ در شاهد و غلظت ۱۰ میلی گرم در لیتر کادمیوم (درجه ۴) حاصل شد. با افزایش غلظت کادمیوم در محیط‌کشت حجم کالوس به طور معنی‌داری در مقایسه با شاهد کاهش پیدا کرد.

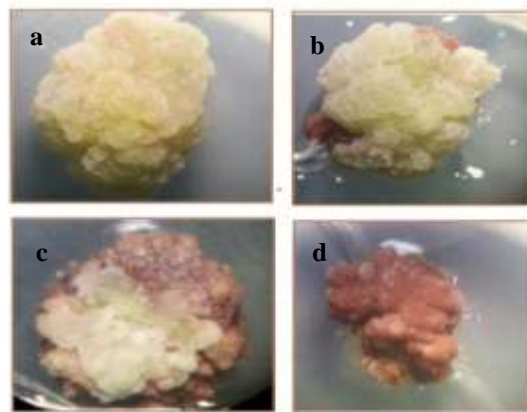
کمترین میزان حجم کالوس با درجه ۱/۱۶ در غلظت ۴۰ میلی گرم در لیتر کادمیوم مشاهده گردید (جدول ۲). نتایج مقایسه میانگین‌ها نشان داد با افزایش غلظت کادمیوم در محیط‌کشت از میزان وزن تر کالوس کاسته شد. بیشترین وزن تر کالوس در شاهد (۱/۰۲ گرم) و کمترین وزن تر (۰/۳۷ گرم) در تیمار ۴۰ میلی گرم در لیتر کادمیوم مشاهده شد که تفاوت معنی‌داری با سایر تیمارها داشت. همچنین صفت وزن خشک نیز با افزایش غلظت فلز کادمیوم در مقایسه با شاهد کاهش یافت و تفاوت معنی‌دار بین غلظت‌ها فقط در غلظت ۱۰ با ۴۰ میلی گرم در لیتر مشاهده شد. بررسی مقایسه میانگین اثر غلظت‌های مختلف کادمیوم بر سرعت نسبی رشد و میزان نسبی آب کالوس نشان داد که افزایش غلظت کادمیوم در محیط‌کشت باعث کاهش معنی‌دار این دو صفت در مقایسه با شاهد شد. بیشترین سرعت رشد نسبی و میزان نسبی آب کالوس در شاهد به ترتیب با میانگین ۶۹/۲۴ و ۹۰/۲۵٪ مشاهده شد که تفاوت معنی‌داری با تیمار ۱۰ میلی گرم در لیتر کادمیوم نداشتند و کمترین آنها در تیمار ۴۰ میلی گرم در لیتر کادمیوم در محیط‌کشت به ترتیب با میانگین ۷/۴۹ و ۸۴/۴۳٪ بدست آمد که تفاوت معنی‌داری با سایر غلظت‌ها داشتند. مقایسه میانگین اثر غلظت کادمیوم بر میزان قهوه‌ای شدن کالوس نشان داد که کمترین میزان قهوه‌ای شدن در شاهد و تیمار ۱۰ میلی گرم در لیتر کادمیوم مشاهده شد. بیشترین درجه قهوه‌ای شدن (با درجه ۵) زمانی که کالوس‌ها در محیط‌کشت دارای ۴۰ میلی گرم در لیتر کادمیوم واکت شدند مشاهده گردید و کالوس‌ها در این تیمار به طور کلی قهوه‌ای شده و از بین رفتند (شکل ۱ و جدول ۳).

نتایج همچنین نشان داد شاخص تحمل در محیط دارای ۱۰ میلی گرم در لیتر کادمیوم بیشترین مقدار (۰/۹۱) را داشت. با افزایش غلظت کادمیوم در محیط میزان شاخص تحمل کاهش پیدا کرد و کمترین تحمل به کادمیوم با مقدار ۰/۵۴ در غلظت ۴۰ میلی گرم در لیتر کادمیوم حاصل شد اما تفاوت معنی‌داری با غلظت ۲۰ میلی گرم در لیتر نداشت (جدول ۴). پس از ۴۵ روز از قرارگیری کالوس‌ها در معرض کادمیوم در محیط‌کشت،

جدول ۲- مقایسه میانگین اثر متقابل غلظت‌های مختلف 2,4-D در BA بر کالوس‌زایی طاووسی

| میزان قهوه‌ای شدن<br>(درجه‌بندی) | حجم کالوس<br>(درجه‌بندی) | القای کالوس<br>(درصد) | زمان انگیزش<br>کالوس (هفته) | BA (mg/l) | 2,4-D (mg/l) |
|----------------------------------|--------------------------|-----------------------|-----------------------------|-----------|--------------|
| ۱/۵۵ <sup>bc</sup>               | ۰ <sup>e</sup>           | ۰ <sup>e</sup>        | ۰ <sup>d</sup>              | صفر       |              |
| ۰/۴۰ <sup>a</sup>                | ۰ <sup>e</sup>           | ۰ <sup>e</sup>        | ۰ <sup>d</sup>              | ۰/۱       | صفر          |
| ۰/۱۸ <sup>a</sup>                | ۰ <sup>e</sup>           | ۰ <sup>e</sup>        | ۰ <sup>d</sup>              | ۰/۲       |              |
| ۰/۱۷ <sup>a</sup>                | ۴/۴۱ <sup>a</sup>        | ۱۰۰ <sup>a</sup>      | ۲/۵ <sup>a</sup>            | صفر       |              |
| ۰/۳۴ <sup>a</sup>                | ۴/۰۶ <sup>a</sup>        | ۹۷/۹۱ <sup>a</sup>    | ۲ <sup>b</sup>              | ۰/۱       | ۰/۵          |
| ۰/۴۱ <sup>a</sup>                | ۳/۴۹ <sup>b</sup>        | ۱۰۰ <sup>a</sup>      | ۲ <sup>b</sup>              | ۰/۲       |              |
| ۱/۶۶ <sup>c</sup>                | ۳/۵۸ <sup>b</sup>        | ۹۱/۶۶ <sup>ab</sup>   | ۱ <sup>c</sup>              | صفر       |              |
| ۱/۱۶ <sup>b</sup>                | ۳/۲۲ <sup>b</sup>        | ۱۰۰ <sup>a</sup>      | ۱ <sup>c</sup>              | ۰/۱       | ۱            |
| ۱/۰۹ <sup>b</sup>                | ۳/۲۸ <sup>b</sup>        | ۷۹/۱۶ <sup>c</sup>    | ۱ <sup>c</sup>              | ۰/۲       |              |
| ۱/۸۴ <sup>c</sup>                | ۱/۷۲ <sup>c</sup>        | ۷۹/۱۶ <sup>c</sup>    | ۱ <sup>c</sup>              | صفر       |              |
| ۲/۳۳ <sup>d</sup>                | ۱/۶۲ <sup>dc</sup>       | ۸۵/۴۱ <sup>bc</sup>   | ۱ <sup>c</sup>              | ۰/۱       | ۲            |
| ۳/۱۱ <sup>e</sup>                | ۱/۲۶ <sup>d</sup>        | ۶۲/۴۹ <sup>d</sup>    | ۱ <sup>c</sup>              | ۰/۲       |              |

میانگین‌های دارای حروف مشابه در هر ستون اختلاف معنی‌داری ندارند.



شکل ۱- میزان رشد و قهوه‌ای شدن کالوس طاووسی در محیط‌کشت دارای غلظت‌های متفاوت کادمیوم (a شاهد، b ۱۰ میلی‌گرم در لیتر، c ۲۰ میلی‌گرم در لیتر و d ۴۰ میلی‌گرم در لیتر)

پس از آن در غلظت ۴۰ میلی‌گرم در لیتر کاهش یافت. کمترین میزان BCF در غلظت ۱۰ میلی‌گرم در لیتر و بیشترین میزان آن در غلظت ۲۰ میلی‌گرم در لیتر مشاهده شد (جدول ۴).

اثر جهش‌زایی EMS در کالوس بر میزان مقاومت و انباشت کادمیوم: تیمار EMS موجب کاهش معنی‌دار میزان رشد، وزن تر و خشک کالوس گردید. بیشترین حجم کالوس

میزان تجمع کادمیوم در کالوس با افزایش غلظت کادمیوم در محیط‌کشت به‌طور معنی‌داری افزایش یافت. کمترین و بیشترین میزان کادمیوم در غلظت ۱۰ و ۴۰ میلی‌گرم در لیتر (به ترتیب ۷۹۱/۳۷ و ۱۰۳/۴۳ میلی‌گرم در کیلوگرم ماده خشک) مشاهده شد. همچنین با افزایش غلظت کادمیوم تا ۲۰ میلی‌گرم در لیتر در محیط‌کشت میزان فاکتور تغلیظ زیستی (BCF) افزایش و

جدول ۳- مقایسه میانگین اثر غلظت فلز کادمیوم بر برخی شاخص‌های رشد در کالوس گیاه طاووسی (*Spartium junceum*)

| غلظت کادمیوم<br>(میلی‌گرم در لیتر) | حجم کالوس<br>(درجه‌بندی) | وزن تر<br>(گرم)    | وزن خشک<br>(گرم)    | میزان نسبی رشد<br>کالوس (%) | میزان نسبی آب<br>کالوس (%) | میزان قهوه‌ای شدن<br>(درجه‌بندی) |
|------------------------------------|--------------------------|--------------------|---------------------|-----------------------------|----------------------------|----------------------------------|
| ۰                                  | ۴/۶۶ <sup>a</sup>        | ۱/۰۲ <sup>a</sup>  | ۰/۰۹۹ <sup>a</sup>  | ۶۹/۲۴ <sup>a</sup>          | ۹۰/۲۵ <sup>a</sup>         | ۱/۳۳ <sup>a</sup>                |
| ۱۰                                 | ۴ <sup>a</sup>           | ۰/۹۱ <sup>ab</sup> | ۰/۰۹ <sup>a</sup>   | ۶۴/۹۱ <sup>a</sup>          | ۹۰/۰۲ <sup>ab</sup>        | ۱/۴۱ <sup>a</sup>                |
| ۲۰                                 | ۲/۶۶ <sup>b</sup>        | ۰/۶۸ <sup>b</sup>  | ۰/۰۷۸ <sup>ab</sup> | ۴۲/۲۲ <sup>b</sup>          | ۸۸/۳۸ <sup>b</sup>         | ۲/۵۸ <sup>b</sup>                |
| ۴۰                                 | ۱/۱۶ <sup>c</sup>        | ۰/۳۷ <sup>c</sup>  | ۰/۰۵۷ <sup>b</sup>  | ۷/۴۹ <sup>c</sup>           | ۸۴/۴۳ <sup>c</sup>         | ۵ <sup>c</sup>                   |

تفاوت بین اعداد مربوط به هر شاخص در هر غلظت دارای حروف مشترک از نظر آماری معنی‌دار نمی‌باشد ( $n=3$  و  $P \geq 0.05$ ).

جدول ۴- اثر غلظت کادمیوم بر شاخص تحمل، میزان انباشتگی و فاکتور BCF در کالوس گیاه طاووسی (*Spartium junceum*)

| غلظت کادمیوم (میلی‌گرم در لیتر) | شاخص تحمل (Ti)     | میزان انباشتگی (میلی‌گرم در کیلوگرم ماده خشک) | BCF                |
|---------------------------------|--------------------|---|--------------------|
| ۰                               | -                  | -   | -                  |
| ۱۰                              | ۰/۹۱ <sup>a</sup>  | ۱۰۳/۴۳ <sup>c</sup>                           | ۱۰/۳۴ <sup>c</sup> |
| ۲۰                              | ۰/۷۹ <sup>ab</sup> | ۵۲۱/۰۸ <sup>b</sup>                           | ۲۶/۰۵ <sup>a</sup> |
| ۴۰                              | ۰/۵۴ <sup>b</sup>  | ۷۹۱/۳۷ <sup>a</sup>                           | ۱۹/۷۸ <sup>b</sup> |

تفاوت بین اعداد مربوط به هر شاخص در هر غلظت دارای حروف مشترک از نظر آماری معنی‌دار نمی‌باشد ( $n=3$  و  $P \geq 0.05$ ).

در شاهد و کمترین آن در تیمار ۱۰ دقیقه EMS مشاهده شد. مقدار وزن تر در شاهد به میزان ۱/۳۲ برابر بیشتر از تیمار ۱۰ دقیقه EMS بود. همچنین میزان وزن خشک نیز در شاهد ۱/۲۷ برابر بیشتر از وزن خشک کالوس‌های تیمار شده با EMS بود (جدول ۵). اعمال تیمار جهش‌زایی با EMS میزان تولید متابولیت‌های ثانوی را هم نسبت به شاهد تحت تأثیر قرار داد. به گونه‌ای که میزان فنل کل در کالوس با اعمال EMS در مقایسه با شاهد تا دو برابر افزایش یافت. همچنین میزان فلاونوئید و فلاونول کل هم در مقایسه با شاهد افزایش پیدا کرد (جدول ۵).

کمترین میزان حجم کالوس مربوط به کالوس‌های تیمار شده با EMS و بدون حضور کادمیوم در محیط‌کشت بود که تفاوت معنی‌داری با کالوس‌های تیمار نشده و در حضور کادمیوم در محیط‌کشت نداشت اما با سایر تیمارها تفاوت معنی‌دار داشت. وزن خشک کالوس‌ها زمانی که کالوس‌ها با EMS تیمار شدند در مقایسه با سایر تیمارها کاهش معنی‌دار داشت. کمترین میزان وزن خشک در کالوس‌های تیمار شده با

EMS مشاهده شد. بیشترین وزن خشک مربوط به شاهد بود که تفاوت معنی‌داری با کالوس‌های تیمار شده و تیمار نشده با EMS و در حضور کادمیوم در محیط‌کشت نداشت. همچنین شاخص تحمل تنش زمانی که کالوس‌ها با EMS تیمار شده و در محیط‌کشت دارای کادمیوم واکشت شدند در مقایسه با کالوس‌های تیمار نشده به میزان دو برابر افزایش داشت (جدول ۶).

#### بحث

بر اساس نتایج این تحقیق هیچ گونه کالوسی در محیط‌کشت فاقد تنظیم‌کننده‌های رشد و همچنین محیط‌کشت تکمیل شده با BA مشاهده نشد. در این پژوهش زمانی که غلظت‌های بیشتر 2,4-D در محیط‌کشت به کار برده شد انگیزش کالوس در کوتاه‌ترین زمان (یک هفته) در مقایسه با غلظت‌های کمتر (۲ هفته) صورت گرفت. نتایج این آزمایش نشان می‌دهد که حضور 2,4-D در غلظت کم جهت القای تشکیل کالوس در این گونه حتی با وجود این‌که سایتوکینین حضور نداشته باشد

جدول ۵- اثر جهش‌زایی EMS بر رشد کالوس و غلظت متابولیت‌های ثانوی در کالوس گیاه طاووسی (*Spartium junceum*)

| کاربرد EMS | حجم کالوس (درجه‌بندی) | وزن تر (گرم)      | وزن خشک (گرم)       | فنل کل (میلی‌گرم گالیک اسید بر گرم ماده تر) | فلاونوئید کل (میلی‌گرم کوئرسیتین بر گرم ماده تر) | فلاونول کل (میلی‌گرم کوئرسیتین بر گرم ماده تر) |
|------------|-----------------------|-------------------|---------------------|---|--|--|
| (شاهد) ۰   | ۴/۳۳ <sup>a</sup>     | ۲/۴۵ <sup>a</sup> | ۰/۳۲۴۳ <sup>a</sup> | ۰/۴۷۰۰ <sup>a</sup>                         | ۰/۲۴۳۴ <sup>a</sup>                              | ۰/۱۲۳۳ <sup>a</sup>                            |
| ۱۰ دقیقه   | ۳/۸۵ <sup>b</sup>     | ۱/۸۵ <sup>b</sup> | ۰/۲۵۴۳ <sup>b</sup> | ۱/۲۰۹۳ <sup>b</sup>                         | ۰/۲۷۰۲ <sup>b</sup>                              | ۰/۱۶۴۷ <sup>b</sup>                            |

تفاوت بین اعداد مربوط به هر شاخص در هر تیمار دارای حروف مشترک از نظر آماری معنی‌دار نمی‌باشد ( $P \geq 0.05$  و  $n=3$ ).

جدول ۶- اثر غلظت کادمیوم و زمان EMS بر حجم کالوس و وزن خشک کالوس گیاه طاووسی (*Spartium junceum*)

| غلظت کادمیوم (میلی‌گرم در لیتر) | مدت زمان اعمال EMS (دقیقه) | حجم کالوس (درجه‌بندی) | وزن خشک کالوس (گرم) | شاخص تحمل (Ti)      |
|---------------------------------|----------------------------|-----------------------|---------------------|---------------------|
| ۰                               | ۰                          | ۴/۳۲ <sup>a</sup>     | ۰/۳۳۸۷ <sup>a</sup> | -                   |
| ۰                               | ۱۰                         | ۳/۳۸ <sup>b</sup>     | ۰/۲۰۱۶ <sup>b</sup> | ۰/۹۱۴۸ <sup>b</sup> |
| ۰                               | ۰                          | ۴ <sup>ab</sup>       | ۰/۳۰۹۸ <sup>a</sup> | -                   |
| ۱۰                              | ۱۰                         | ۴/۶۶ <sup>a</sup>     | ۰/۳۰۷۱ <sup>a</sup> | ۱/۴۸۶۱ <sup>a</sup> |

تفاوت بین اعداد مربوط به هر شاخص در هر تیمار دارای حروف مشترک از نظر آماری معنی‌دار نمی‌باشد ( $P \geq 0.05$  و  $n=3$ ).

ترکیبات و غلظت این تنظیم‌کننده‌های رشد باید برای هر گونه گیاهی تعریف شده باشد (Loredo-Carrillo *et al.*, 2013) و راندمان این واکنش‌ها بستگی به گونه و بافت گیاهی دارد (Castro *et al.*, 2001). نتایج نشان داد 2,4-D برای القای کالوس ضروری است و اضافه‌کردن BA در غلظت‌های خاص بر رشد کالوس در ریزنمونه گره‌ای اثری نگذاشت. در چمن برموداگرس کاربرد 2,4-D سبب انگیزش سریع‌تر کالوس و کالوس‌زایی بیشتر شد و اضافه‌کردن BA به محیط‌کشت اثر منفی بر میزان تولید و زمان انگیزش کالوس از ریزنمونه گره‌ای داشت که با نتایج این آزمایش مشابهت دارد (تقی زاده و همکاران، ۱۳۹۰). به‌گونه‌ای مشابه در گونه علفی *Vigna subterranea* L. از تیره پروانه آسها، کاربرد ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D به تنهایی در محیط‌کشت، بهترین تنظیم‌کننده رشد برای القای کالوس است (Konate *et al.*, 2013). به‌گونه‌ای مشابه با نتایج این تحقیق بیشترین القا و رشد کالوس در محیط‌کشت دارای غلظت کم 2,4-D (۲ میلی‌گرم در لیتر) در

ضروری است. 2,4-D به‌عنوان یک نوع از اکسین‌ها شناخته شده که جهت القا و تشکیل مؤثر کالوس در بسیاری از گونه‌های گیاهی تأیید شده است که با نتایج این آزمایش همسو می‌باشد (Osman *et al.*, 2016). تأثیر 2,4-D در القای تشکیل کالوس به خصوصیت اصلی آن که می‌تواند تحریک تقسیم سلولی از بافت‌های گیاهی و ممانعت شدید از اندام‌زایی نسبت داده شود (Sauer *et al.*, 2013).

در این تحقیق بیشترین درصد القای کالوس و بیشترین حجم کالوس در محیط‌کشت تکمیل‌شده با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D صورت گرفت و با افزایش غلظت 2,4-D درصد القا و حجم کالوس کاهش یافت. این نشان می‌دهد که نوع و غلظت اکسین به‌طور متفاوتی بر واکنش کالوس‌زایی ریزنمونه‌های گره‌ای طاووسی اثر می‌گذارد. 2,4-D به صورت گسترده هم به‌تنهایی و یا در ترکیب با سیتوکینین‌ها به ویژه BA جهت تحریک القای کالوس و به دست‌آوردن ترکیبات فعال زیستی در شرایط درون‌شیشه‌ای به‌کار برده می‌شود. به هر حال

در حضور کادمیوم باشد که منجر به تنش اکسیداتیو می‌گردد (Gomes-Junior et al., 2006).

جهت ارزیابی ظرفیت کالوس برای رشد در حضور غلظت‌های مختلف کادمیوم شاخص تحمل تنش محاسبه شده است. گیاهانی با شاخص تحمل بیشتر از ۰/۶ متحمل هستند (Lux et al., 2004). در این مطالعه دریافت شد که در غلظت‌های کم کادمیوم، کشت‌های کالوس تحمل بیشتری داشتند و می‌توان ذکر کرد طاووسی در مرحله کالوس نسبتاً مقاوم به کادمیوم مقاوم است. با این وجود در غلظت‌های بیشتر (۴۰ میلی‌گرم در لیتر) تحمل کمتری مشاهده شد. نتایج همچنین نشان داد بیشترین میزان تجمع کادمیوم در غلظت ۴۰ میلی‌گرم در لیتر حاصل شد حتی با وجود اینکه کمترین میزان تحمل در این غلظت صورت گرفت، به عبارتی شاخص تحمل با میزان انباشتگی رابطه عکس داشت. این امر دلیل رشد ناچیز کالوس در این غلظت می‌باشد. در غلظت ۲۰ میلی‌گرم در لیتر، کالوس طاووسی ۵۳۰ میلی‌گرم در کیلوگرم وزن خشک کادمیوم را انباشته کرد که سطح خوبی و در بالای حد شاخص فرارناشتگی کادمیوم (۱۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم کادمیوم) است (Brooks, 1998).

در این مطالعه کمترین میزان BCF در غلظت ۱۰ میلی‌گرم در لیتر کادمیوم در مقایسه با دو غلظت دیگر مشاهده شد که می‌تواند به توانایی حفظ و کنترل ورود و خروج فلز به داخل سلول نسبت داده شود (Iori et al., 2012). بیشترین میزان BCF در غلظت ۲۰ و ۴۰ میلی‌گرم در لیتر و با تفاوت معنی‌دار نسبت به همدیگر و غلظت ۱۰ میلی‌گرم در لیتر صورت گرفت که نشان‌دهنده این است که اختلال در فعالیت غشای سلول در این غلظت‌ها صورت گرفته است و با کاهش رشد قابل ملاحظه در این غلظت مطابقت دارد.

فلاونوئیدها گروهی از متابولیت‌های ثانوی هستند که نقش‌های حفاظتی متنوعی مانند فعالیت آنتی‌اکسیدانی دارند و این ترکیبات به‌عنوان محافظ در برابر فلزات سنگین عمل می‌کنند. فلاونوئیدها ترکیباتی با فلزات سنگین تشکیل می‌دهند و این امر سبب ایجاد یک پاسخ دفاعی مؤثر در تنش فلزات

درختچه *Decalepis hamiltoni* بدست آمد (Umesh, 2014). در این مطالعه کاربرد خارجی سیتوکینین BA به تنهایی و در ترکیب با 2,4-D اثری بر القا و رشد کالوس نداشت. این امر حاکی از آن است که حضور سیتوکینین اثر مثبت و منفی بر رشد و پرآوری کالوس نداشت. مطابق نتایج این آزمایش نتایج مشابهی در سویا مبنی بر عدم اثر سیتوکینین بر رشد کالوس بدست آمده است (Sairam et al., 2003). مشابه نتایج این پژوهش کالوس‌زایی زمانی که ریزنمونه‌های گره‌ای در درختچه *Decalepis hamiltoni* در محیط کشت با ترکیبات مختلف BA کشت شده بودند بسیار آهسته بود (Umesh, 2014).

در این پژوهش بررسی اثر غلظت کادمیوم روی شاخص‌های رشد کالوس نشان داد حضور کادمیوم در محیط کشت در غلظت‌های زیاد اثر منفی بر حجم کالوس، میزان نسبی رشد و آب نسبی کالوس داشت در حالی که در غلظت‌های کم اثر نامطلوب و بازدارندگی بر رشد کالوس نداشت. فلزات کادمیوم و روی مشخصات ساختاری و محیطی مشابه دارند و نشان داده شده است که کادمیوم می‌تواند جایگزین روی در سلول شود. اثر تحریک‌کنندگی غلظت‌های کم کادمیوم بر رشد سلول‌ها در کشت درون‌شیشه‌ای به رقابت بین روی و کادمیوم برای جایگاه‌های اتصال سلولی ارتباط دارد (Sobkowiak et al., 2004). در تحقیق حاضر وزن تر کالوس در حضور غلظت‌های زیاد کادمیوم مهار شد در حالی که در غلظت کم کادمیوم در مقایسه با غلظت‌های بیشتر کاهش غیرمحسوسی از وزن تر مشاهده گردید. کاهش وزن تر بافت‌های گیاهی یک واکنش معمول به حضور فلز سنگین است و احتمالاً به دلیل کاهش پتانسیل آب در سلول‌ها در اثر تنش اسمزی است (Sharma and Dubey, 2005). تولید وزن خشک کالوس طاووسی نیز در غلظت ۴۰ میلی‌گرم در لیتر در مقایسه با شاهد تحت تأثیر قرار گرفت. میزان ماده خشک موجود در گیاهان به شدت بستگی به جذب عناصر غذایی دارد. همچنین در این پژوهش کالوس‌ها در غلظت زیاد کادمیوم (۴۰ میلی‌گرم در لیتر) قهوه‌ای شده و از بین رفتند. این امر می‌تواند نشان‌دهنده اکسیداسیون ترکیبات فنلی به کوئینین

همسو با این نتایج در برنج میزان رشد کالوس‌های تیمار شده با اشعه گاما در محیط‌کشت دارای NaCl در مقایسه با کالوس‌های تیمار نشده بیشتر بود (Saleem *et al.*, 2005). نتایج مشابهی در تربچه توسط Lee و همکاران (۲۰۰۳) بدست آمده است. اعتقاد بر این است که حداقل تنش مناسب از طریق تیمار پرتوتابی ممکن است تغییرات ژنتیکی برگشت‌ناپذیر را القا نکند اما می‌تواند تشکیل کالوس را تحریک کند (Saleem *et al.*, 2005). در سیب‌زمینی شیرین هر دو کالوس‌های شاهد و جهش‌یافته بدون اختلاف معنی‌دار به‌خوبی رشد کردند. اما در محیط‌کشت تکمیل‌شده با غلظت‌های مختلف نمک کالوس‌های تیمار شده با EMS رشد بهتری در مقایسه با شاهد داشتند (Luan *et al.*, 2007).

شاخص تحمل تنش در این تحقیق زمانی که کالوس‌های تیمار شده با EMS در محیط دارای کادمیوم رشد کردند در مقایسه با شاهد افزایش معنی‌دار داشت. این امر نشان می‌دهد کالوس‌های تیمار شده مقاومت بیشتری در مقایسه با شاهد دارند. مطابق با این نتایج Luan و همکاران (۲۰۰۷) نیز از EMS برای القای جهش و گزینش درون‌شیشه‌ای گیاهان مقاوم به شوری و باززایی گیاه در سیب‌زمینی شیرین استفاده کردند و لاین‌های کالوسی مقاوم به شوری در محیط‌کشت دارای ۲۰۰ میلی‌مولار NaCl را مشاهده کردند. همچنین Hossein و همکاران (۲۰۰۶) در گل داوودی با استفاده از تکنیک جهش‌زایی درون‌شیشه‌ای از طریق ماده جهش‌زای EMS گیاهان مقاوم به شوری را به‌دست آوردند. جهش‌زایی با استفاده از EMS و Na<sub>3</sub>N، جهت به‌دست آوردن گیاهان مقاوم به آلومینیوم در گیاه جو انجام شده است و ۱۲ لاین سلولی مقاوم به آلومینیوم از طریق این مواد جهش‌زا حاصل شده است (Zhu *et al.*, 2003). در چمن برموداگرس زمانی که کالوس‌های جنین‌زا با غلظت‌های مختلف سرب تیمار شدند پس از اولین انتقال گیاهچه‌های مقاوم ارزیابی شدند و برخی از گیاهچه‌های حاصل از کشت درون‌شیشه‌ای افزایش جذب سرب را نشان دادند (Taghizadeh *et al.*, 2015) که نتایج این محققان با دستاورد این پژوهش مبنی بر کار آمد بودن EMS در

سنگین می‌شود (Korkina, 2007). افزایش میزان فلاونول‌ها نیز معمولاً به‌عنوان نشانه‌ای از افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی اندام‌های گیاهی است (Park *et al.*, 1991). علاوه بر این طی تنش فلزات سنگین ترکیبات فنلی به‌عنوان کلات‌کننده‌های فلزات عمل می‌کنند و از سوی دیگر ترکیبات فنلی مستقیماً گونه‌های فعال اکسیژن را حذف می‌کنند (Michalak, 2006). در این پژوهش افزایش ترکیبات فنلی به‌وضوح نشان‌دهنده پاسخ‌های حفاظتی القاشده در برابر غلظت‌های بیشتر کادمیوم بود. در این مطالعه میزان متابولیت‌های ثانوی (فنل، فلاونوئید و فلاونول کل) در کالوس‌های تیمار شده با EMS افزایش پیدا کرد که این نتایج به گونه‌ای مشابه در نتایج سایر محققان نیز گزارش شده است. برای مثال، در گل ساعتی در کالوس‌های پرتوتابی‌شده با اشعه UV-B تولید فلاونوئید افزایش پیدا کرد (Antognoni *et al.*, 2007). در کالوس‌های تیمار شده گیاه دارویی رزماری با اشعه گاما میزان متابولیت‌های فنل و فلاونوئید افزایش یافته است (El-Beltagi *et al.*, 2011). Pawar و همکاران (۲۰۱۰) گزارش دادند که میزان متابولیت ثانویه ۶-gingerol با افزایش غلظت EMS افزایش پیدا کرد. Chauhan و Kumar (2007) نیز گزارش دادند میزان آلکالوئید در اجزای گیاه *Phyllanthus niruri* حاصل از بذرهای تیمار شده با EMS نسبت به شاهد بسیار بیشتر بود. این نتایج نشان می‌دهد که دامنه وسیعی از جهش‌زایی در فیزیولوژی گیاهی جهت القای تغییرات فیزیولوژیکی و در نتیجه تولید متابولیت‌های ثانویه وجود دارد (Hamid *et al.*, 2015).

پس از اینکه کالوس‌های تیمار شده با EMS در محیط‌کشت تکمیل‌شده با ۱۰ و ۲۰ میلی‌گرم در لیتر کادمیوم واگشت شدند در غلظت ۲۰ میلی‌گرم در لیتر تمامی توده‌های کالوس که تحت تیمار EMS قرار گرفته بودند از بین رفتند (داده‌ها نشان داده نشده است) اما در غلظت ۱۰ میلی‌گرم در لیتر کالوس‌ها زنده ماندند. همچنین کالوس‌های تیمار شده مقاومت بیشتری در مقایسه با شاهد داشتند و وزن خشک کالوس‌های تیمار شده با EMS که در محیط‌کشت دارای کادمیوم واگشت شده بودند در مقایسه با کالوس‌های تیمار نشده افزایش معنی‌دار داشت.

جهش‌زایی مشابهت دارد.

### نتیجه‌گیری

نتایج نشان داد که بیشترین میزان کالوس‌زایی با کمترین میزان قهوه‌ای شدن ریزنمونه در محیط‌کشت تکمیل‌شده با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D بود. با افزایش غلظت کادمیوم شاخص‌های رشدی در کالوس شامل حجم کالوس، وزن تر و خشک کالوس، میزان نسبی آب و میزان نسبی رشد کالوس و شاخص تحمل کاهش اما میزان قهوه‌ای شدن کالوس با افزایش غلظت کادمیوم افزایش یافت. در حضور کادمیوم غلظت متابولیت‌های ثانوی شامل فنل، فلاونوئید و فلاونول کل در مقایسه با شاهد افزایش پیدا کرد. همچنین با افزایش غلظت کادمیوم در محیط‌کشت، انباشت کادمیوم در کالوس افزایش یافت. بیشترین میزان تجمع کادمیوم ۷۹۱/۳۱ میلی‌گرم در کیلوگرم وزن خشک در غلظت ۴۰ میلی‌گرم در لیتر حاصل شد. رشد کالوس‌های تیمار شده با EMS کاهش یافت ولی فعالیت آنتی‌اکسیدان‌های غیرآنزیمی شامل فنل، فلاونوئید و فلاونول کل نسبت به شاهد افزایش یافت. اعمال EMS نتوانست میزان انباشتگی کادمیوم را در کالوس افزایش دهد ولی شاخص تحمل کالوس طاووسی بهبود داد. از این مطالعه می‌توان این گونه نتیجه‌گیری کرد که روش جهش‌زایی درون‌شیشه‌ای با EMS توانست تحمل به تنش کادمیوم را در غلظت‌های کمتر از ۴۰ میلی‌لیتر را افزایش دهد هر چند میزان

تجمع کادمیوم با کالوس معنی‌دار نشد. دلیل این امر می‌تواند تصادفی بودن جهش و احتمال وقوع جهش در سایر صفات کالوس مانند افزایش وزن خشک بود. همچنین روش کشت درون‌شیشه‌ای ابزاری کار آمد برای گزینش کالوس‌های مقاوم به کادمیوم و انباشتگر در طاووسی محسوب شد. بنابراین می‌توان اظهارنظر کرد که توده‌های کالوسی مقاوم در طاووسی می‌توانند گزینه خوبی برای باززایی گیاهان مقاوم به سمیت کادمیوم باشند. از طرفی طاووسی به دلیل تولید زیست‌توده بالا و مقاومت به تنش‌های خشکی، شوری و خاک‌های سنگلاخی و همچنین مقاومت به سطوح زیاد کادمیوم در شرایط درون‌شیشه‌ای (براساس مطالعه حاضر) می‌تواند گزینه مناسبی برای کشت در مناطق فضای سبز آلوده به کادمیوم باشد. البته جهت پی‌بردن به احتمال کاربرد این گونه گیاهی نیاز به بررسی‌های تکمیلی جهت تحمل انباشتگی و انتقال کادمیوم در طی باززایی درون‌شیشه‌ای و پس از آن ارزیابی پتانسیل گیاه‌پالایی و مقاومت در شرایط طبیعی مانند گلخانه و مزرعه نیز است.

### تشکر و قدردانی

بدین وسیله از معاونت پژوهشی دانشگاه اراک که پشتیبانی مالی این طرح را در قالب پایان نامه کارشناسی ارشد تقبل نمودند سپاسگزاری می‌شود.

### منابع

- Abdel-Kadder, E. M., Lashin, I. I., Aref, M. S., Hussian, E. A. and Ewais, E. A. (2014) Physical elicitation of *Dillenia indica* callus for production of secondary metabolites. *New York Science Journal* 7: 48-57.
- Abeyasinghe, D. C., Wijerathne, S. M. N. K. and Dharmadasa R. M. (2014) Secondary metabolites contents and antioxidant capacities of *Acmella Oleraceae* grown under different growing systems. *World Journal of Agricultural Research* 2: 163-167.
- Antognoni, F., Zheng, S., Pagnucco, C., Baraldi, R., Poli, P. and Biondi, S. (2007) Induction of flavonoid production by UV-B radiation in *Passiflora quadrangularis* callus cultures. *Fitoterapia*. 78: 345-352.
- Arici, S. E., Tuncel, Z. N., Kara, A. and Caltılı, O. (2017) In vitro mutagenesis and selection of potato mutants resistance to fusarium dry root (*Fusarium avenaceum*). *Comm. Appl. Biol. Sci*, Ghent University, 82(3).
- Benavides, M. P., Gallego, S. M. and Tomaro, M. L. (2005) Cadmium toxicity in plants. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 17: 21-34.
- Brooks, R. R. (1998) *Plants that hyperaccumulate heavy metals*. CAB International, Wallingford. UK.
- Chauhan, P. and Kumar, P. (2007) Influence of an alkylating agent (EMS) on production of alkaloid contents in *Phyllanthus niruri*. *International Journal of Plant Science*. 2: 219-220.

- Clematisa, F., Viglioneb, S., Berutob, M., Lanzottic, V., Dolcid, P., Poncete, C. and Curira, P. (2014) Endogenous isoflavone methylation correlates with the in vitro rooting phases of *Spartium junceum* L. (Leguminosae). *Journal of Plant Physiology* 171: 1267-1275.
- Confalonieri, M., Balestrazzi, A., Bisoffi, S. and Carbonera, D. (2003) In vitro culture and genetic engineering of *Populus* spp.: synergy for forest tree improvement. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 73: 109-138.
- El-Beltagi, H. S., Ahmed, O. K. and El-Desouky, W. (2011) Effect of low doses g-irradiation on oxidative stress and secondary metabolites production of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) callus culture. *Radiation Physics and Chemistry*. 80: 968-976.
- Gomes-Junior, R. A., Moldes, C. A., Delite, F. S., Pompeu, G. B., Gratao, P. L., Mazzafera, P., Lea, P. J. and Azevedo, R. A. (2006) Antioxidant metabolism of coffee cell suspension culture response to cadmium. *Chemosphere* 65: 1330-1337.
- Hamid, R., Kamili, A. N., Gucel, S., Ozturk, M. and Ahmad, P. (2015) Analysis of physiobiochemical attributes, some key antioxidants and esculin content through HPLC in in vitro grown *Cichorium intybus* L. treated with ethylmethane sulfonate. *Plant Growth Regulatory* 76:233-241.
- Hossein, Z., Mandal, A. K. A., Datta, S. K. and Biswas, A. K. (2006) Development of NaCl-tolerant strain in *Chrysanthemum morifolium* Ramat. Through in vitro mutagenesis. *Plant Biology* 8: 450-461.
- Ilias, S. and Travlos, I. S. (2009) Seed germination of several invasive species potentially useful for biomass production or revegetation purposes under semiarid condition. *Acta Biologica Cracoviensia, Series Botanica* 51: 35-37.
- Iori, V., Pietrini, F., Massacci, A. and Zacchini, M. (2012) Induction of metal binding compounds and antioxidative defence in callus cultures of two black poplar (*P. nigra*) clones with different tolerance to cadmium. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 108: 17-26.
- Israr, M., Sahi, S. V. and Jain, J. (2006) Cadmium accumulation and antioxidative responses in the *Sesbania drummondii* callus. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 50: 121-127.
- Konate, S., Kone, M., Kouakou, H. T., Kouadio, J. Y. and Zouzou, M. (2013) Callus induction and proliferation from cotyledon explants in *Bambara Groundnut*. *African Crop Science Journal*. 21: 255-263.
- Korkina, L. G. (2007) Phenylpropanoids as naturally occurring antioxidants: From plant defense to human health. *Cellular and Molecular Biology* 53: 15-25.
- Lee, H. Y., Kim, J. S., Baek, M. H., Yoo, J. C. and Kwon, S. T. (2003) Effects of low-dose irradiation on the physiological activities of radish (*Raphanus sativus*) during early growth and reduction of ultraviolet-B stress. *Journal of the Korean Society for Horticultural Science*. 44: 314-320.
- Liu, K., Shen, L. and Sheng, J. (2008) Improvement in cadmium tolerance of tomato seedlings with an antisense DNA for 1- aminocyclopropane-1-carboxylatesynthase. *Journal of Plant Nutrition* 31: 809-827.
- Loredo-Carrillo, S. E., Santos-Diaz, M. D., Leyva, E. and Santos-Diaz, M. D. (2013) Establishment of callus from *Pyrostegia venusta* (Ker Gawl.) miers and effect of abiotic stress on flavonoids and sterols accumulation. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology* 22: 312-318.
- Luan, Y. S., Zhang, J., Gao, X. R. and An, L. J. (2007) Mutation induced by ethylmethanesulphonate (EMS), in vitro screening for salt tolerance and plant regeneration of sweet potato (*Ipomoea batatas* L.). *Plant Cell and Tissue Organ Culture* 88: 77-81.
- Lux, A., Sottnikova, A., Opatrna, J. and Greger, M. (2004) Differences in structure of adventitious roots in *Salix* clones with contrasting characteristics of cadmium accumulation and sensitivity. *Physiologia Plantarum* 120: 537-545.
- Michalak, A. (2006) Phenolic compounds and their antioxidant activity in plants growing under heavy metal stress. *Polish Journal of Environmental Studied* 15: 523-530.
- Milusheva, D. I., Iakimova, E. T. and Atanassova, B. Y. (2015) Cadmium and lead effects on growth performance of *Zinnia* (*Zinnia marilandica*). *Agricultural Academy Bulgaria* 97: 631-635.
- Nehnevajova, E., Herzig, R., Erismann, K. H. and Schwitzguebel, J. P. (2007) In vitro breeding of *Brassica juncea* L. to enhance metal accumulation and extraction properties. *Plant Cell Rep.*, 26: 429-37.
- Oggiano, N., Angelini, L. G. and Cappelletto, P. (1997) Pulping and paper properties of some fiber crops. *Industrial Crops and Products* 7: 59-67.
- Osman, N. I., Sidik, N. J. and Awal, A. (2016) Effects of variations in culture media and hormonal treatments upon callus induction potential in endosperm explant of *Barringtonia racemosa* L. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 6: 143-147.
- Park, J. W., Shin, Y. K. and Lee, C. S. (1991) The protective actions of rutin and quercetin on the Cu<sup>2+</sup> plus H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induced collagen degradation. *Korean Biochemistry Journal* 24: 182-186.
- Pawar, N., Nimbalkar, M., Pai, S., Kolar, F. and Dixit, G. (2010) RP-HPLC analysis of 6-gingerol and assessment of antioxidant activities in EMS treated ginger. *Journal of Phytology* 2: 13-23.
- Piotto, F. A., Tulmann-Neto, A., Franco, M. R., Boaretto, L. F. and Azevedo, R. A. (2014) Rapid screening for selection of heavy metal-tolerant plants. *Crop Breeding and Applied Biotechnology* 14: 1-7.

- Proestos, C., Boziaris, I. S., Nychas, G. J. E. and Komaitis, M. (2006) Analysis of flavonoids and phenolic acids in Greek aromatic plants: investigation of the antioxidant capacity and microbial activity. *Food Chemistry* 95: 664-71.
- Sairam, R. V., Franklin, G., Hassel, R., Smith, B., Meeker, K., Kashikar, N., Parani, M., Al Abed, D., Ismail, S., Berry, K. and Goldman, S. L. (2003) A study on the effect of genotypes, plant growth regulators and sugars in promoting plant regeneration via organogenesis from soybean cotyledonary nodal callus. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*.75: 79-85.
- Saleem, M. Y., Mukhtar, Z., Cheema, A. A. and Atta, B. M. (2005) Induced mutation and in vitro techniques as a method to induce salt tolerance in Basmati rice (*Oryza sativa* L.). *International Journal of Invironmental Science* 2: 141-145.
- Sauer, M., Robert, S. and Klein-Vehn, J. (2013) Auxin: simply complicated. *Journal of Experimental Botany* 64: 2565-77.
- Schutzendubel, A., Nikolova, P., Rudolf, P. and Polle, A. (2002) Cadmium and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative stress in *Populus canescens* roots. *Plant Physiology and Biochemistry* 40: 577-584.
- Sharma, P. and Dubey, R. M. (2005) Lead toxicity in plants. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 17: 35-52.
- Sobkowiak, R., Rymer, K., Rucinska, R. and Deckert, J. (2004) Cadmium induced changes in antioxidant enzymes in suspension culture soybean cells. *Acta Biochimica Polonica* 51: 219-222.
- Taghizadeh, M., Kafi, M. and Fattahi-Moghadam, M. R. (2015) Breeding by in vitro culture to improve tolerance and accumulation of lead in *Cynodon Dactylon* L. *Journal of Agriculture and Science Technology* 17: 1851-1860.
- Tahsili, J., Sharifi, M., Safaie, N., Esmaeilzadeh-Bahabadi, S. and Behmanesh, M. (2013) Induction of lignans and phenolic compounds in cell culture of *Linum album* by culture filtrate of *Fusarium graminearum*. *Journal of Plant Interactions* 9: 412-417.
- Umesh, T. G. (2014) In vitro callus induction and antioxidant potential of *Decalepis hamiltoni* (white and arn). *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* 6: 452-456.
- Zhu, M. Y. Y., Pan, J. W., Wang, L. L., Gu, Q. and Huang, C. Y. (2003) Mutation induced enhancement of Al tolerance in barley cell lines. *Plant Science*. 164: 17-23.

## The effect of EMS on Cd Resistance and Accumulation in *Spartium junceum* callus as an ornamental shrub

Mahboubeh Ganji Dastjerdi<sup>1</sup>, Mina Taghizadeh\*<sup>1</sup>, Ali Khadivi<sup>1</sup>, Mansour Ghorbanpour<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Department of Horticultural Sciences, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Arak University, Arak, Iran

<sup>2</sup> Department of Medicinal plant, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Arak University, Iran

(Received: 04/04/2018, Accepted: 06/08/2018)

### Abstract

In vitro mutagenesis has been applied for the selection of plants tolerant to stress including heavy metal stress. The objective of the present study was to induce *in vitro* mutation on increasing resistance and accumulation evaluation using EMS in calli of *Spartium junceum* L. In the first experiment, the effects of different concentrations of 2,4-D and BA were investigated on the callus induction in nodal explant. Then, calli initiated were exposed to cadmium (0, 10, 20 and 40 mg L<sup>-1</sup>). The final experiment, calli were treated with 0.2% EMS for 10 minutes. Afterward, the treated calli were sub-cultured to medium supplemented with 0 and 10 mgL<sup>-1</sup> Cd. The highest callus formation and the lowest explant browning were obtained on the medium supplemented with 0.5 mg L<sup>-1</sup> 2,4-D. Result showed that the callus growth parameters decreased with increasing Cd concentrations in medium. In presence of Cd, contents of secondary metabolites increased compared with the control. Cd accumulation in callus increased with increasing Cd concentrations. The highest Cd accumulation was found 791.33 mg Cd kg<sup>-1</sup> of dry weight at 40 mgL<sup>-1</sup> Cd. Results showed that the growth of the calli treated by EMS decreased whereas the activities of non- enzymatic antioxidant compared with the control. The application EMS was not increased Cd accumulation while tolerance index calli of *Spartium junceum*.

**Key words:** Mutagenesis, Heavy metal, Callus, Ornamental plant, Phytoremediation.

Corresponding author, Email: m-taghizadeh@araku.ac.ir