اثر EMS در ایجاد مقاومت و تجمع کادمیوم در کالوس درختچه زینتی طاووسی

محبوبه گنجی دستجردی[۱]، مینا تقی‌زاده[۱*]، علی خدیوی[۱] و منصور قربانپور[۲]

[۱] گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه اراک، [۲] 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 به‌کار 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 زینتی 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 ٤٠ 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 قهوه‌ای‌شدن ریزنمونه در محیط‌کشت تکمیل‌شده با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D بود. با افزایش غلظت کادمیوم شاخص‌های رشدی و شاخص تحمل در کالوس کاهش اما میزان قهوه‌ای‌شدن 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 محیط‌کشت، انباشت کادمیوم در کالوس افزایش یافت. بیشترین میزان تجمع کادمیوم ۷۹۱/۳۱ میلی‌گرم در کیلوگرم وزن خشک در غلظت ٤٠ میلی‌گرم در لیتر حاصل شد. رشد کالوس‌های تیمارشده باEMS 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 را بهبود داد.

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

مقدمه

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 غیرضروری است که برای گیاهان بسیار سمی است و سبب جلوگیری از رشد و متعاقباً مرگ گیاه 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

*نویسنده مسؤل، نشانی پست الکترونیکی: m-taghizadeh@araku.ac.ir

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2025-02-16]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1398.8.32.26.4]

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. به‌دلیل اینکه گیاهان زینتی 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 زینتی مقاوم به فلزات سنگین چشم‌انداز امیدوارکننده‌ای دارد. با این وجود گزارش‌ها مبنی بر شناسایی چنین گونه‌های زینتی 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 زینتی-دارویی است که از نظر اقتصادی مهم‌ترین درختچه لگومیان، همیشه‌سبز، چندساله، دارای ٤-۲ 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 به‌دلیل 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 وکیفی 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 به‌دلیل 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 کشت‌سلولی گیاه را به‌دلیل 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

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2025-02-16]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1398.8.32.26.4]

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، ۱و ۲ میلی‌گرم در لیتر) استفاده گردید. ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر PVP (پلی‌وینیل پیرولیدین) جهت جلوگیری از قهوه‌ای‌شدن 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 اتوکلاوکردن در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد و به‌مدت ۲۰ دقیقه و فشار ۱/۲ اتمسفر روی ۵/۸ -۵/۷ تنظیم شد. ریزنمونه‌های گره‌ای ضدعفونی‌شده (با اتانول ۷۰٪ به‌مدت 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 قهوه‌ای‌شدن ریزنمونه نیز ثبت شدند. میزان قهوه‌ای‌شدن 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 تکمیل‌شده با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر ایندول بوتریک اسید (IBA) و دو میلی‌گرم در لیتر (بنزیل آدنین) BA (بهترین شرایط تست‌شده برای رشد و استقرار کالوس) و نیترات کادمیوم در غلظت‌های صفر، ۱۰، ۲۰ و ۴۰ میلی‌گرم در لیتر واکشت‌شده 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 تیمارشده 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 تست‌شده 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 وزن‌شده انتقال‌یافته و مجدداً توزین شدند. با کم‌کردن 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 خارج‌شدن از آون توزین

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2025-02-16]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1398.8.32.26.4]

جدول ۱- درجه‌بندی کالوس از نظر میزان قهوه‌ای‌شدن و اندازه کالوس

درجه‌بندی	میزان قهوه‌ای‌شدن کالوس	اندازه کالوس
۰	عدم قهوه‌ای‌شدن	عدم‌رشد
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 ۱cm- ۰/۵)
٤	بین متوسط و زیاد	بین متوسط و زیاد
۵	کاملاً قهوه‌ای	زیاد (قطر کالوس بیشتر از ۱ cm)

شدند.

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

$$RGR\ (\%) = (Wi-Wj)/Wj \times 100$$ (فرمول ۱)

Wi: وزن نهایی کالوس پس از ٤۵ روز، Wj: وزن اولیه در زمان انتقال به محیط‌کشت دارای کادمیوم

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

$$RWC\ (\%) = (FW-DW) \times 100/FW$$ (فرمول ۲)

FW: وزن تر کالوس، DW: وزن خشک کالوس

میزان قهوه‌ای‌شدن و اندازه کالوس براساس درجه‌بندی (۵-۰) ارزیابی گردید (جدول ۱).

اندازه‌گیری کادمیوم: پس از ٤۵ روز از واکشت کالوس‌ها، کالوس‌های خشک‌شده به خوبی پودر شدند. اندازه‌گیری کادمیوم طبق روش Israr و همکاران (۲۰۰٦) با استفاده از دستگاه ICP-MS و در طول‌موج ۲۲۸/۸۰۲ نانومتر صورت گرفت. شاخص تحمل تنش (Ti) در کالوس با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید:

$$Ti = (DWi/DWj)$$ (فرمول ۳)

DWi: میانگین وزن خشک کالوس در محیط دارای کادمیوم، DWj: میانگین وزن خشک کالوس در محیط فاقد کادمیوم

فاکتور تغلیظ زیستی (BCF) برای کادمیوم طبق فرمول زیر محاسبه شد:

(فرمول ٤)

غلظت کادمیوم در محیط‌کشت/غلظت کادمیوم در کالوس=BFC(%)

اندازه‌گیری میزان متابولیت‌های ثانوی: جهت تهیه عصاره میزان ۰/۳ گرم بافت کالوس با ٦ میلی‌لیتر متانول ۸۰ ٪ در حضور نیتروژن مایع سائیده شد. سپس به مدت ۳۰ دقیقه در دور ٤۲۰۰ rpm سانتریفیوژ گردید (Abeysinghe *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 ٦۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه و در تاریکی قرار گرفتند، جذب نمونه‌ها با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر در طول‌موج ۷٦۲ 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 (۲۰۱٤) محاسبه شد. مقدار دو میلی‌لیتر محلول کلرید آلومینیوم ۲ ٪ با دو میلی‌لیتر عصاره متانولی ترکیب شدند. پس از گذشت ٦۰ دقیقه در دمای اتاق و تاریکی جذب نمونه‌ها با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر در طول‌موج ٤۲۰ 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٪ 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

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2025-02-16]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1398.8.32.26.4]

طول‌موج ٤٤٥ نانومتر خوانده شد. در نهایت میزان فلاونوئید و فلاونول کل بر حسب میلی‌گرم 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 معنی‌داربودن 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 میلی‌گرم در لیتر2,4-D در محیط‌کشت به‌کار 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 به‌غیر 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 میلی‌گرم در لیتر اثر منفی بر درصد القای کالوس از ریزنمونه گره‌ای طاووسی در حضور و عدم‌حضور BA نداشت اما در غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر2,4-D به تنهایی و در ترکیب با BA به‌طور 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 قهوه‌ای‌شدن در مقایسه با شاهد در تیمار دو میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر BA بود و کمترین میزان قهوه‌ای‌شدن مربوط به کاربرد ۰/۵ میلی‌گرم 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 ٤٥ روز از اعمال تنش کادمیوم در محیط‌کشت نشان داد بیشترین میزان حجم کالوس با درجه ٤/٦٦ در شاهد و غلظت ۱۰ میلی‌گرم در لیتر کادمیوم (درجه ٤) حاصل شد. با افزایش غلظت کادمیوم در محیط‌کشت حجم کالوس به‌طور معنی‌داری در مقایسه با شاهد کاهش پیدا کرد. کمترین میزان حجم کالوس با درجه ۱/۱٦ در غلظت ٤٠ میلی‌گرم 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 ٤٠ میلی‌گرم 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 ٤٠ میلی‌گرم 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 ٦٩/٢٤ و ۹۰/۲۵ ٪ مشاهده شد که تفاوت معنی‌داری با تیمار ۱۰ میلی‌گرم در لیتر کادمیوم نداشتند و کمترین آنها در تیمار ٤٠ میلی‌گرم در لیتر کادمیوم در محیط‌کشت به ترتیب با میانگین ۷/٤۹ و ۸٤/٤۳ ٪ بدست آمد که تفاوت معنی‌داری با سایر غلظت‌ها داشتند. مقایسه میانگین اثر غلظت کادمیوم بر میزان قهوه‌ای‌شدن کالوس نشان داد که کمترین میزان قهوه‌ای‌شدن در شاهد و تیمار ۱۰ میلی‌گرم در لیتر کادمیوم مشاهده شد. بیشترین درجه قهوه‌ای‌شدن (با درجه ٥) زمانی که کالوس‌ها در محیط‌کشت دارای ٤٠ میلی‌گرم در لیتر کادمیوم واکشت شدند مشاهده گردید و کالوس‌ها در این تیمار به‌طور کلی قهوه‌ای شده و از بین رفتند (شکل ۱ و جدول ۳).

نتایج همچنین نشان داد شاخص تحمل در محیط دارای ۱۰ میلی‌گرم 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 ۰/٥٤ در غلظت ٤٠ میلی‌گرم در لیتر کادمیوم حاصل شد اما تفاوت معنی‌داری با غلظت ۲۰ میلی‌گرم در لیتر نداشت (جدول ٤). پس از ٤٥ روز از قرارگیری کالوس‌ها در معرض کادمیوم در محیط‌کشت،

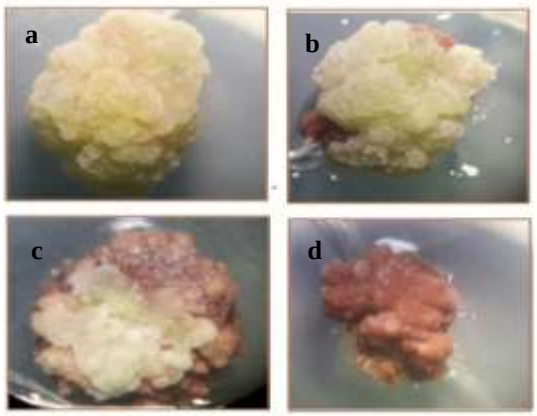
[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2025-02-16]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1398.8.32.26.4]

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

2,4-D (mg/l)	BA (mg/1)	زمان انگیزش کالوس (هفته)	القای کالوس (درصد)	حجم کالوس (درجه‌بندی)	میزان قهوه‌ای‌شدن (درجه‌بندی)
صفر	صفر	۰ d	۰ e	۰ e	۱/۵۵ bc
	۰/۱	۰ d	۰ e	۰ e	۰/٤۰ a
	۰/۲	۰ d	۰ e	۰ e	۰/۱۸ a
۰/۵	صفر	۲/۵ a	۱۰۰ a	٤/٤۱ a	۰/۱۷ a
	۰/۱	۲ b	۹۷/۹۱ a	٤/۰٦ a	۰/۳٤ a
	۰/۲	۲ b	۱۰۰ a	۳/٤۹ b	۰/٤۱ a
۱	صفر	۱ c	۹۱/٦٦ ab	۳/۵۸ b	۱/٦٦ c
	۰/۱	۱ c	۱۰۰ a	۳/۲۲ b	۱/۱٦ b
	۰/۲	۱ c	۷۹/۱٦ c	۳/۲۸ b	۱/۰۹ b
۲	صفر	۱ c	۷۹/۱٦ c	۱/۷۲ c	۱/۸٤ c
	۰/۱	۱ c	۸۵/٤۱ bc	۱/٦۲ dc	۲/۳۳ d
	۰/۲	۱ c	٦۲/٤۹ d	۱/۲٦ d	۳/۱۱ e

میانگین‌های دارای حروف مشابه در هر ستون اختلاف معنی‌داری ندارند.



شکل ۱- میزان رشد و قهوه‌ای‌شدن کالوس طاووسی در محیط‌کشت دارای غلظت‌های متفاوت کادمیوم (a شاهد، b۱۰ میلی‌گرم در لیتر، c ۲۰ میلی‌گرم در لیتر و d ٤۰ میلی‌گرم در لیتر)

میزان تجمع کادمیوم در کالوس با افزایش غلظت کادمیوم در محیط‌کشت به‌طور معنی‌داری افزایش یافت. کمترین و بیشترین میزان کادمیوم در غلظت ۱۰ و ٤۰ میلی‌گرم در لیتر (به ترتیب ۱۰۳/٤۳ و ۷۹۱/۳۷ 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 پس از آن در غلظت ٤۰ 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 ٤).

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

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2025-02-16]
[DOR: 20.1001.1.23222727.1398.8.32.26.4]

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

غلظت کادمیوم (میلی‌گرم در لیتر)	حجم کالوس (درجه‌بندی)	وزن تر (گرم)	وزن خشک (گرم)	میزان نسبی رشد کالوس (٪)	میزان نسبی آب کالوس (٪)	میزان قهوه‌ای‌شدن (درجه‌بندی)
۰	٤/٦٦ a	۱/۰۲ a	۰/۰۹۹ a	٦۹/۲٤ a	۹۰/۲۵ a	۱/۳۳ a
۱۰	٤ a	۰/۹۱ ab	۰/۰۹ a	٦٤/۹۱ a	۹۰/۰۲ ab	۱/٤۱ a
۲۰	۲/٦٦ b	۰/٦۸ b	۰/۰۷۸ ab	٤۲/۲۲ b	۸۸/۳۸ b	۲/۵۸ b
٤۰	۱/۱٦ c	۰/۳۷ c	۰/۰۵۷ b	۷/٤۹ c	۸٤/٤۳ c	۵ c

تفاوت بین اعداد مربوط به هر شاخص در هر غلظت دارای حروف مشترک از نظر آماری معنی‌دار نمی‌باشد (P≥ ۰/۰۵ و n=۳).

جدول ٤- 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 a	۱۰۳/٤۳ c	۱۰/۳٤ c
۲۰	۰/۷۹ ab	۵۲۱/۰۸ b	۲٦/۰۵ a
٤۰	۰/۵٤ b	۷۹۱/۳۷ a	۱۹/۷۸ b

تفاوت بین اعداد مربوط به هر شاخص در هر غلظت دارای حروف مشترک از نظر آماری معنی‌دار نمی‌باشد (P≥ ۰/۰۵ و n=۳).

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 تیمارشده 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 (جدول۵).

کمترین میزان حجم کالوس مربوط به کالوس‌های تیمارشده با EMS و بدون حضور کادمیوم در محیط‌کشت بود که تفاوت معنی‌داری با کالوس‌های تیمارنشده 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 تیمارشده با EMS مشاهده شد. بیشترین وزن خشک مربوط به شاهد بود که تفاوت معنی‌داری با کالوس‌های تیمارشده و تیمارنشده با EMS و در حضور کادمیوم در محیط‌کشت نداشت. همچنین شاخص تحمل تنش زمانی که کالوس‌ها با EMS تیمارشده و در محیط‌کشت دارای کادمیوم واکشت شدند در مقایسه با کالوس‌های تیمارنشده به میزان دو برابر افزایش داشت (جدول٦).

بحث

براساس نتایج این تحقیق هیچ گونه کالوسی در محیط‌کشت فاقد تنظیم‌کننده‌های رشد و همچنین محیط‌کشت تکمیل‌شده با BA مشاهده نشد. در این پژوهش زمانی که غلظت‌های بیشتر 2,4-D در محیط‌کشت به‌کار 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

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2025-02-16]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1398.8.32.26.4]

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	٤/٣٣ a	٢/٤٥ a	۰/٣٢٤٣ a	۰/٤٧۰۰ a	۰/٢٤٣٤ a	۰/١٢٣٣ a
۱۰ دقیقه	٣/٨٥ b	١/٨٥ b	۰/٢٥٤٣ b	١/٢۰٩٣ b	۰/٢٧۰٢ b	۰/١٦٤٧ b

تفاوت بین اعداد مربوط به هر شاخص در هر تیمار دارای حروف مشترک از نظر آماری معنی‌دار نمی‌باشد (P≥ ۰/۰۵ و n=۳).

جدول ٦- 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	٤/٣٢ a	۰/٣٣٨٧ a	-
	۱۰	٣/٣٨ b	۰/٢۰١٦ b	۰/٩١٤٨ b
۱۰	۰	٤ ab	۰/٣۰٩٨ a	-
	۱۰	٤/٦٦ a	۰/٣۰٧١ a	١/٤٨٦١ a

تفاوت بین اعداد مربوط به هر شاخص در هر تیمار دارای حروف مشترک از نظر آماری معنی‌دار نمی‌باشد (P≥ ۰/۰۵ و n=۳).

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 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 آساها، 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

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2025-02-16]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1398.8.32.26.4]

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 عدم‌اثر 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 محیط‌کشت 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 محیط‌کشت در غلظت های 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 به‌دلیل 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) قهوه‌ای‌شده و از بین رفتند. این امر می‌تواند نشان‌دهنده اکسیداسیون ترکیبات فنلی به کوئینین 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 فراانباشتگی 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

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2025-02-16]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1398.8.32.26.4]

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 تیمارشده 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 تیمارشده 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 ٦–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 تیمارشده 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 درنتیجه تولید متابولیت‌های ثانویه وجود دارد (Hamid *et al*., 2015).

پس از اینکه کالوس‌های تیمارشده با EMS در محیط‌کشت تکمیل‌شده با ۱۰ و ۲۰ میلی‌گرم در لیتر کادمیوم واکشت 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 تیمارشده مقاومت بیشتری در مقایسه با شاهد داشتند و وزن خشک کالوس‌های تیمارشده با EMS که در محیط‌کشت دارای کادمیوم واکشت شده بودند در مقایسه با کالوس‌های تیمارنشده افزایش معنی‌دار داشت. همسو با این نتایج در برنج میزان رشد کالوس‌های تیمارشده با اشعه گاما در محیط‌کشت دارای NaCl در مقایسه با کالوس‌های تیمارنشده 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 تیمارشده با EMS رشد بهتری در مقایسه با شاهد داشتند (Luan *et al*., 2007).

شاخص تحمل تنش در این تحقیق زمانی که کالوس‌های تیمارشده با EMS در محیط دارای کادمیوم رشد کردند در مقایسه با شاهد افزایش معنی‌دار داشت. این امر نشان می‌دهد کالوس‌های تیمارشده 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 (۲۰۰٦) 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 NaN3، جهت به دست‌آوردن 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 آمدبودن EMS در

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2025-02-16]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1398.8.32.26.4]

جهش‌زایی مشابهت دارد.

نتیجه‌گیری

نتایج نشان داد که بیشترین میزان کالوس‌زایی با کمترین میزان قهوه‌ای‌شدن 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 قهوه‌ای‌شدن 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 تیمارشده باEMS 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 تصادفی‌بودن 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 به‌دلیل 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.

Abeysinghe, 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 Caltili, 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.

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2025-02-16]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1398.8.32.26.4]

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 secondarymetabolites 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 *Chrysunthemum 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 revegetetion 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^{2+} plus H_2O_2 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.

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2025-02-16]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1398.8.32.26.4]

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_2O_2-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 Polinica 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.

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2025-02-16]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1398.8.32.26.4]

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

Mahboubeh Ganji Dastjerdi [1], Mina Taghizadeh* [1], Ali Khadivi[1], Mansour Ghorbanpour[2]

[1] Department of Horticultural Sciences, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Arak University, Arak, Iran

[2]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^{-1}). 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^{-1} Cd. The highest callus formation and the lowest explant browning were obtained on the medium supplemented with 0.5 mg L^{-1} 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^{-1} of dry weight at 40 mgL^{-1} 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

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2025-02-16]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1398.8.32.26.4]