اصلاح جهشی به‌منظور افزایش توان تجمع کادمیوم در درختچه گز در مرحله کالوس

پروین کریمی[۱]، مینا تقی‌زاده*[۲]، موسی سلگی[۳]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۱۱/۱۴
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۸/۱۸

چکیده

گیاه‌پالایی به‌عنوان روشی مقرون به‌صرفه و سازگار با محیط‌زیست، در پاک‌سازی خاک‌های آلوده به فلزات سنگین به‌کار می‌رود. پژوهش حاضر با هدف بررسی مقاومت و پالایندگی کالوس‌های درختچه‌ی گز تحت تاثیر القای جهش با استفاده از اتیل متان سولفونات انجام شد. در مرحله‌ی اول بهینه کردن القای کالوس و جهش در محیط کشت دارای غلظت‌های مختلف 2,4-انجام شد. آزمایش سوم شامل ارزیابی میزان مقاومت و پالایش کالوس در غلظت‌های صفر تا چهل میلی‌گرم در لیتر کادمیوم در دو نوع ریزنمونه تیمار شده و نشده با EMS بود. غلظت یک میلی‌گرم در لیتر 2,4-D بیشترین میزان زنده‌مانی و القای کالوس کمترین زمان را ایجاد نمود. اعمال EMS با غلظت ۰/۲ درصد و زمان سی دقیقه بیشترین میزان زنده‌مانی و کمترین میزان سیاه شدن ریزنمونه‌ها را ایجاد کرد. بیشترین میزان تجمع کادمیوم به‌میزان ۱۰۵۳/۵۶ میلی‌گرم در کیلوگرم ماده خشک کالوس در غلظت چهل میلی‌گرم در لیتر کادمیوم به‌دست آمد.

واژه‌های کلیدی: ***اتیل متان سولفونات، جهش‌زایی، فلزات سنگین ، کشت بافت، گیاه‌پالایی***

مقدمه

در سال‌های اخیر، حجم زیاد آلاینده‌های محیط زیست ناشی از فعالیت‌های انسانی به یک مشکل عمده در زندگی بشر تبدیل شده است (Soudek *et al.*, 2011). فلزات سنگین با انتقال و تجمع در بدن حیوانات و انسان و ایجاد جهش منجر به تخریب DNA و سرطان‌زایی می‌گردند (Knasmüller *et al.*, 1998). کادمیوم نقش زیستی شناخته شده‌ای در گیاهان ندارد ولی در غلظت‌های زیاد یکسری تغییرات بیوشیمیایی، ساختاری و فیزیولوژیکی را القا می‌کند (Nagajyoti *et al.*, 2010). این فلز در آژانس ثبت بیماری‌ها و مواد سمی آمریکا به‌عنوان هفتمین عنصر خطرناک رده‌بندی شده است (Clemens & Ma, 2016). به‌منظور حذف کادمیوم و آلاینده‌های دیگر از نواحی آلوده، روش‌های زیستی به‌طور موفقیت‌آمیز به‌کار گرفته شده‌اند (Zacchini *et al.*, 2009). گیاه‌پالایی در سال‌های اخیر به‌عنوان یک راهکار مفید و مقرون به‌صرفه برای کاهش آلودگی‌های خاک با فلزات

۱- دانشجوی فارغ التحصیل کارشناسی ارشد، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه اراک
۲- استادیار، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه اراک
*(نویسنده مسئول: m-taghizadeh@araku.ac.ir)
۳- دانشیار، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه اراک

سنگین مورد توجه قرار گرفته است. این روش ظرفیت گیاهان بومی را برای استخراج فلز از خاک از طریق جذب ریشه‌ای با ویژگی‌های فراانباشت آن‌ها برای پاک‌سازی مناطق آلوده مورد استفاده قرار می‌دهد (Soudek *et al.*, 2011). پالایش گیاهی ویژگی‌های زیستی و فیزیکی خاک را حفظ و بازیابی زیستی فلزات سنگین را فراهم می‌کند و روش سازگار با محیط زیست، نسبتاً ارزان و ساده می‌باشد (Yang *et al.*, 2002).

بیوتکنولوژی گیاهی با استفاده از کشت سلول و تبدیل بافت به یک ابزار اصلاحی کاربردی در اصلاح مقاومت گیاهان به تنش‌های غیرزیستی مانند تنش‌های فلزات سنگین و ایجاد محیط مناسب برای گزینش گیاهان مقاوم به این تنش را در مدت زمان کوتاه و فضای کم فراهم می‌کند (Taghizadeh *et al.*, 2015). کشت کالوس مدلی مناسب برای مطالعات سوخت و سازهای سلولی، ارزیابی مقاومت به فلزات سنگین و فرآیندهای سم‌زدایی در گیاهان می‌باشد و نسبت به گیاه کامل سازمان‌دهی سلولی و بافت ساده‌تر دارد و بیشتر تحت تاثیر شرایط محیط و تنش فلز قرار می‌گیرد (Nehnevajova *et al.*, 2007). تکنیک جهش‌زایی به‌طور گسترده در اصلاح گیاهان با ایجاد تنوع ژنتیکی و تولید آلل‌های جدید با اهداف مختلف به کار گرفته می‌شود (Piotto *et al.*, 2014). این تکنیک با هدف تعیین ظرفیت سلول‌های گیاهی در تحمل، جذب، سم‌زدایی، سوخت و ساز و ذخیره گستره‌ی وسیعی از آلاینده‌های فلزی و آلی در کنار کشت درون‌شیشه‌ای در مطالعات بسیار به‌کار گرفته شده است و فرصت‌هایی نظیر قابل کنترل بودن محیط، القای تنوع، ایجاد جمعیت انبوه، گزینش و تکثیر سریع به‌دست می‌دهد (Xu et al., 2012). ماده جهش‌زا EMS (Ethyl methanesulfonate) یکی از موثرترین و پرکاربردترین مواد مورد استفاده در القای جهش در تحقیقات زیستی است (Zhang *et al.*, 2014)

درخت گز (*Tamarix* sp.) یک گیاه مهم مقاوم به شوری است که به طور گسترده در اراضی شنی و مناطق شورقلیایی نواحی خشک و نیمه خشک می‌روید (Ma *et al.*, 2011). بر اساس گزارشی پنج درصد از کادمیوم جذب شده توسط اندام هوایی درخت گز از طریق غدد نمکی موجود در برگ‌های گز دفع شده است. تجمع ۲۸۵ نانومول کادمیوم در گرم وزن خشک در اندام هوایی و دفع ۹/۸ نانومول در گرم ماده خشک در طی هشت روز قرارگیری گیاهچه‌ها در معرض محلول دارای چهل و پنج میکرومولار کادمیوم گزارش شده است (Hagemeyer & Waisel, 1988). تجمع پنج قسمت در میلیون کادمیوم در کشت هیدروپونیک *T. smyrnensis* کشت شده در محلول هیدروپونیک به‌مدت ده روز گزارش شده است. این در حالی است که افزودن نمک با غلظت ۱۰۰ قسمت در میلیون در محیط کشت میزان تجمع کادمیوم را به چهل قسمت در میلیون در این گیاه افزایش داد (Manousaki *et al.*, 2009). همچنین *T. smyrnensis* در بستر کشت دارای شانزده میلی‌گرم کادمیوم و ۸۰۰ میلی‌گرم سرب در کیلوگرم وزن خشک بستر، تجمع ۲۰۰ میلی‌گرم سرب در کیلوگرم وزن خشک گیاه و ۰/۴ میلی‌گرم در کیلوگرم کادمیوم را در برگ‌ها نشان داده است. در این بررسی تجمع عمده‌ی سرب در ریشه و کادمیوم در برگ‌ها به‌دست آمد و افزایش غلظت نمک در محیط کشت میزان انتقال کادمیوم به برگ‌ها را افزایش داد؛ در صورتی‌که در انتقال سرب موثر نبود. علاوه بر این دفع مقادیر

قابل توجه کادمیوم و سرب از غدد نمکی در سطوح برگی این گیاه گزارش شده است (Kadukova *et al.*, 2008). دفع ۰/۱ میکروگرم کادمیوم در گرم ماده خشک برگ در سطوح برگی *T. smyrnensis* از طریق کریستال‌های نمکی ترشح شده از بافت غددی نشان داد که ریشه‌های این گیاه مقاوم به کادمیوم، انتخاب‌پذیری کم در جذب یون‌ها از خاک دارد و ترکیب ترشحات این غدد به ترکیب محیط ریشه بستگی دارد. دفع کادمیوم از طریق غدد برگی می‌تواند توجیه‌کننده‌ی غلظت کم این فلز در شاخساره (۰/۳ قسمت در میلیون) و یکی از سازوکارهای تحمل تنش فلزات سنگین در این گیاه باشد (Manousaki *et al.*, 2008). به‌طور کلی گیاهان مقاوم به شوری سازگاری بهتری نسبت به تنش‌های محیطی مانند فلزات سنگین دارند و برای مطالعات گیاه‌پالایی پیشنهاد می‌شوند (Ghanaya *et al.*, 2007). بنابراین گز می‌تواند به عنوان یک گزینه نویدبخش در حذف فلزات سنگین نه تنها در خاک‌های معمولی، بلکه در خاک‌های شور در نظر گرفته شود (Ma *et al.*, 2011).

بر این اساس هدف از انجام مطالعه حاضر، ارزیابی پتانسیل استفاده از کشت درون شیشه‌ای درختچه‌ی زینتی گز و القای تنوع با استفاده از ماده جهش‌زای EMS به‌عنوان عاملی برای افزایش تحمل گیاه به فلز کادمیوم، افزایش قابلیت تجمع فلزی آن و مدلی برای گیاه پالایی بود.

مواد و روش‌ها

آزمایش اول- اثر غلظت‌های مختلف 2,4-D بر کالوس‌زایی گز

پایه‌های مادری با قلمه‌گیری از باغ گیاه‌شناسی ملی ایران از رقم زینتی گز *Tamarix aphylla* در اواسط اسفندماه ۱۳۹۴ تهیه و در گلخانه تحقیقاتی گروه باغبانی دانشگاه اراک ریشه‌دار شدند. از قطعات انتهایی یا میانی ساقه‌ی حاصل رشد فصل جاری همراه با فلس و ساقه‌ی یک‌ساله بدون فلس به طول یک الی دو سانتی‌متر برای تهیه‌ی ریزنمونه استفاده شد. این آزمایش با هدف بررسی اثر غلظت‌های مختلف 2,4-D در ریزنمونه‌های ساقه‌ی فصل جاری و یک‌ساله گز، بر مراحل کالوس‌زایی انجام شد. ریزنمونه‌ها توسط اتانول هفتاد درصد به‌مدت شصت ثانیه و سپس هیپوکلریت سدیم بیست درصد به‌مدت ده دقیقه گندزدایی شدند. ریزنمونه‌های گز تحت تیمار پنج غلظت مختلف 2,4-D شامل غلظت‌های صفر، ۰/۵، ۱، ۲ و ۴ میلی‌گرم در لیتر محیط کشت MS (تکمیل شده با سی گرم در لیتر ساکارز و هفت گرم در لیتر آگار) قرار گرفتند. کشت‌ها در اتاقک رشد دارای دمای ۲۳ درجه سانتی‌گراد و ۱۶ ساعت روشنایی نگهداری شدند و پس از گذشت یک هفته، هر روز ارزیابی آن‌ها به‌منظور ثبت آغاز زمان انگیزش کالوس صورت گرفت. پس از گذشت یک ماه شاخص‌های حجم کالوس، درصد القای کالوس و میزان ترشح فنل ارزیابی و ثبت شد. حجم کالوس بر اساس درجه‌بندی نمره داده شد. عدم تشکیل کالوس رتبه صفر، حجم کم (قطر توده کالوس کمتر از ۰/۵ سانتی‌متر) رتبه یک، حجم متوسط (بین ۱- ۰/۵ سانتی‌متر) رتبه سه و حجم زیاد (بیش از ۱ سانتی‌متر) رتبه پنج داده شد. میزان تجمع فنل و درصد سیاه شدن بافت ریزنمونه در پنج سطح یک تا نه ارزیابی شد؛ بدین ترتیب که

فقدان ترشحات قهوه‌ای در ریزنمونه با شماره یک و قهوه‌ای شدن خیلی زیاد و مرگ ریزنمونه با شماره نه مشخص شد (تقی‌زاده و همکاران، ۱۳۹۵؛ گنجی، ۱۳۹۵). آزمایش به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با دوعامل نوع ریزنمونه و غلظت هورمون 2,4-D با پنج تکرار اجرا شد.

آزمایش دوم- بهینه کردن القای جهش در ریزنمونه‌های گز در شرایط درون‌شیشه‌ای

به‌منظور بهینه کردن شرایط القای جهش در ریزنمونه‌های حاصل از شاخه‌های فصل جاری گز دو عامل غلظت و مدت زمان اعمال EMS ارزیابی شدند. در این آزمایش ریزنمونه‌ها در دو غلظت متفاوت ۰/۲ و ۰/۴ درصد EMS و در سه سطح زمانی صفر، سی و شصت دقیقه تحت تیمار قرار گرفتند. تکان دادن مداوم محلول برای تماس بیشتر با ریزنمونه‌ها در طی این زمان انجام گرفت. بعد از اتمام زمان‌های مورد نظر، ریزنمونه‌ها با احتیاط خارج و به‌منظور حذف بقایای ماده‌ی جهش‌زای سمی هشت مرتبه با آب مقطر استریل شستشو داده شدند؛ سپس گندزدایی آن‌ها به‌روش اتانول هفتاد درصد به‌مدت شصت ثانیه و هیپوکلریت سدیم بیست درصد به‌مدت ده دقیقه انجام شد. ریزنمونه‌های گندزدایی شده در محیط کشت دارای 2,4-D با غلظت یک میلی‌گرم در لیتر کشت شدند. پس از گذشت یک هفته زنده‌مانی ریزنمونه‌ها ارزیابی و ثبت شد؛ سپس بررسی کشت‌ها به‌منظور ثبت زمان آغاز انگیزش کالوس هر روز انجام شد. اندازه‌گیری حجم کالوس، میزان زنده‌مانی ریزنمونه‌ها و ترشح فنل انجام گرفت و درصد القای کالوس ثبت گردید. این آزمایش به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با دو عامل غلظت ماده‌ی جهش‌زای EMS و زمان اعمال آن بر ریزنمونه‌های گز اجرا شد.

آزمایش سوم- بررسی میزان مقاومت و پالایش گز در مرحله کالوس نسبت به کادمیوم

در این آزمایش از کالوس‌های هشت هفته‌ای حاصل از ریزنمونه‌های تحت تیمار EMS (غلظت ۰/۲ درصد و زمان سی دقیقه) و شاهد (بدون تیمار EMS) استفاده گردید. کالوس‌ها تقریباً در اندازه‌های مشابه و یکسان در محیط کشت MS دارای یک میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و نیترات کادمیوم ($Cd(NO_3)_2.4H_2O$) در غلظت‌های مختلف صفر، ده، بیست و چهل میلی‌گرم بر لیتر انتقال داده شدند و تحت شرایط مشابه در اتاقک رشد قرار گرفتند. این آزمایش نیز به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با دو نوع ریزنمونه و غلظت نیترات کادمیوم اجرا شد. پس از چهل روز صفات مربوط به کالوس‌زایی بررسی و ثبت گردید. ارزیابی صفات در این آزمایش بر مبنای نرخ رشد نسبی (Relative Growth Rate)، کالوس، وزن تر و خشک، شاخص تحمل (Index of Tolerance)، محتوای آب کالوس (Callus water content) ، نشت یونی (Electrolyte leakage)، میزان تجمع فلز در توده‌های کالوس و فاکتور تجمع زیستی (Bioconcentration Factor) انجام گرفت.

اندازه‌گیری صفات

صفات کیفی کالوس مانند حجم، میزان زنده‌مانی ریزنمونه‌ها میزان ترشح فنل و سیاه شدن کالوس به‌صورت درجه‌بندی ارزیابی و ثبت شد.

نرخ رشد نسبی کالوس‌ها با توجه به فرمول زیر محاسبه شد(Patade *et al.*, 2008):

$$\%RGR = [(wf - wi) \times 100]/wi$$

W_i نشان‌دهنده وزن اولیه کالوس و W_f نشان‌دهنده وزن نهایی در تیمارهای مختلف می‌باشد.

اندازه‌گیری محتوای نسبی آب در کالوس‌های تحت تیمار با استفاده از فرمول زیر انجام گرفت (Errabii *et al*., 2006):

$$WC = (Wf - Wd)/Wd$$

در این فرمول W_f برابر با وزن تر کالوس و W_d وزن خشک کالوس را نشان می‌دهد.

شاخص میزان تحمل بر پایه نرخ رشد نسبی کالوس‌ها با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید(Al-Bahrany & Al-Khayri 2004).

$$INTOL = RGRt/RGRc$$

RGR_t نمایان‌گر نرخ رشد نسبی کالوس در تیمار و RGR_c نرخ رشد نسبی کالوس در شاهد را نشان می‌دهد.

میزان تجمع فلز کادمیوم با استفاده از روش Israr و همکاران (۲۰۰۶) در دستگاه اسپکترومتری نشری پلاسمای جفت‌شونده القایی (ICP-OES) با طول موج ۲۲۸/۸۰۲ نانومتر اندازه‌گیری شد و غلظت کادمیوم در هریک از تیمارها بر حسب میلی‌گرم در کیلوگرم ماده خشک گیاهی محاسبه و ثبت گردید. فاکتور تجمع زیستی در کالوس‌ها به‌عنوان نسبت غلظت عناصر کم‌یاب در بافت‌های گیاهی در مواجهه با محیط‌های دارای مقادیر بیشتر این عناصر محاسبه می‌شود. این فاکتور با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید (Iori *et al.*, 2012):

$$BCF = P/E$$

P در این فرمول غلظت عنصر در بافت گیاهی (mg/kg ماده خشک) و E غلظت عنصر در محیط کشت (mg/L) را نشان می‌دهد

میزان نشت یونی در کالوس‌ها با استفاده از دستگاه EC متر اندازه‌گیری شد و با فرمول زیر محاسبه گردید (Azevedo *et al.*, 2005):

$$EL\% = (Lt/La) \times 100$$

در این فرمول Lt معرف هدایت الکتریکی محلول قبل از قرارگیری در بن‌ماری و La هدایت الکتریکی محلول پس از گرمادهی می‌باشد.

نتایج و بحث

آزمایش اول- اثر غلظت‌های مختلف 2,4-D بر کالوس‌زایی گز

با توجه به جدول مقایسه‌ی میانگین اثر غلظت هورمون 2,4-D افزایش تا سطح یک میلی‌گرم در لیتر اثر تحریکی بر درصد انگیزش کالوس داشت. غلظت‌های ۰/۵ و یک میلی‌گرم در لیتر 2,4-D به‌ترتیب با میانگین ۹۴ و ۹۶ درصد کالوس‌زایی، بیشترین میزان القای کالوس را در ریزنمونه‌های گز باعث شده‌اند. وجود هورمون 2,4-D در غلظت‌های صفر و زیاد در محیط کشت اثر منفی بر حجم کالوس نشان داد و کاهش حجم کالوس القایی در ریزنمونه‌های گز را به‌دنبال داشت؛ به‌گونه‌ای که افزایش غلظت این اکسین تا میزان یک میلی‌گرم در لیتر روند افزایشی حجم کالوس را ایجاد کرد و بیشترین حجم کالوس (۴/۲۶) را در این گیاه به‌خود اختصاص داد. محیط کشت دارای هورمون یک میلی‌گرم در لیتر 2,4-D با میانگین ۱۱/۴۰ روز کمترین زمان القای کالوس را ایجاد کرد؛ اگرچه با محیط دارای ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و شاهد اختلاف معنی‌دار نداشت. از طرف دیگر افزایش غلظت 2,4-D به بیش از سطح ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر ترشح فنل را به‌میزان بسیار زیاد در ریزنمونه‌ها افزایش داد؛ به‌نحوی‌که کمترین میزان ترشح فنل (۰/۸۶) در غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر هورمون 2,4-D ترشح شد (جدول ۱). ریزنمونه‌های فصل جاری با ایجاد اختلاف معنی‌دار نسبت به ریزنمونه‌های ساقه‌ی یک‌ساله کمترین زمان انگیزش کالوس را نشان دادند. همچنین ریزنمونه‌های فصل جاری ترشح فنل کمتر را نسبت به ساقه‌ی یک‌ساله در محیط کشت نشان دادند (جدول۲). به‌طور کلی با در نظرگرفتن تمامی نتایج، تیمار یک میلی‌گرم در لیتر هورمون 2,4-D بر ریزنمونه‌های فصل جاری به‌دلیل ایجاد حداکثر سرعت انگیزش، حجم و القای کالوس به‌عنوان محیط کشت بهینه جهت القای کالوس در گیاه گز معرفی می‌شود.

جدول ۱: مقایسه‌ی میانگین اثر غلظت هورمون 2,4-D بر صفات کالوس‌زایی گز

2,4-D (mg/L)	القای کالوس (درصد)	حجم کالوس (درجه‌بندی)	زمان انگیزش کالوس (روز)	ترشح فنل (درجه‌بندی)
صفر	۵۴/۰۰^{b}	۰/۶۳^{C}	۱۲/۳۰^{a}	۱/۱۵^{ab}
۰/۵	۹۴/۰۰^{a}	۳/۴۴^{b}	۱۱/۷۰^{a}	۰/۸۶^{a}
۱	۹۶/۰۰^{a}	۴/۲۶^{a}	۱۱/۴۰^{a}	۱/۴۷^{bc}
۲	۵۰/۰۰^{b}	۰/۷^{C}	۲۰/۳۰^{b}	۱/۶۰^{c}
۴	۵۰/۰۰^{b}	۰/۷^{C}	۲۲/۸۰^{c}	۳/۶۱^{d}

در هر ستون حروف مشابه تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال پنج درصد آزمون دانکن نشان ندادند.

جدول ۲: مقایسه‌ی میانگین اثر نوع ریزنمونه بر صفات کالوس‌زایی گز

تیمار	زمان انگیزش کالوس (روز)	ترشح فنل (درجه بندی)
ساقه یک‌ساله	۱۷/۴۰^{b}	۲/۳۶^{b}
ساقه فصل جاری	۱۴/۰۰^{a}	۱/۱۰^{a}

در هر ستون حروف مشابه تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال پنج درصد آزمون دانکن نشان ندادند.

افزایش غلظت هورمون 2,4-D تا سطح یک میلی‌گرم در لیتر کالوس‌زایی بیشتر و انگیزش سریع‌تر در ریزنمونه‌های گز را القا نمود. غلظت‌های خیلی کم و زیاد اکسین در محیط کشت کاهش کالوس‌زایی را در ریزنمونه‌ها نشان داد. بدین ترتیب می‌توان گفت ریزنمونه‌های گز در شرایط کشت درون‌شیشه‌ای به غلظت‌های کم اکسین خارجی برای القای کالوس نیاز دارند و غلظت زیاد این هورمون در تعادل هورمونی موجود میان اکسین و سایتوکینین درونی گیاه تداخل ایجاد می‌کند. هم‌سو با این نتایج، غلظت یک میلی‌گرم در لیتر 2,4-D بیشترین انگیزش کالوس در مدت زمان پنج الی هفت روز در ریزنمونه‌های ریشه برنج ایجاد نمود (Hoque & Mansfield, 2004). معمولا به‌منظور کاربرد اکسین در غلظت زیاد در محیط‌های کشت بافت از غلظت‌های زیاد 2,4-D استفاده نمی‌شود زیرا منجر به سرکوب ریخت‌زایی در گیاهان می‌گردد (Sharma *et al.*, 2013). از طرفی با توجه به زمان انگیزش کالوس کمتر، حجم و درصد القای کالوس یکسان در ریزنمونه‌های فصل جاری با ساقه‌ی یک‌ساله می‌توان گفت این ریزنمونه‌ها جهت القای کالوس‌زایی انتخاب مناسبی می‌باشند. مرحله نموی ریزنمونه نقش مهمی در القای کالوس‌ها و باززایی گیاهان ایفا می‌کند (Hoque & Mansfield, 2004). در این آزمایش بهترین تیمار با ترشح فنل کمتر در ریزنمونه‌های فصل جاری و غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D به‌دست آمد و با افزایش غلظت تنظیم‌کننده‌ی رشد در محیط کشت میزان ترشح فنل افزایش یافت. به‌طور مشابه در کشت بافت پرنده بهشتی (*Strelitzia reginae*) افزایش غلظت تنظیم‌کننده‌های رشدی اکسین و سایتوکینین روند افزایشی در ترشح فنل را نشان داده است (North *et al.*, 2012).

آزمایش دوم- بهینه کردن القای جهش در ریزنمونه‌های گز در شرایط درون‌شیشه‌ای

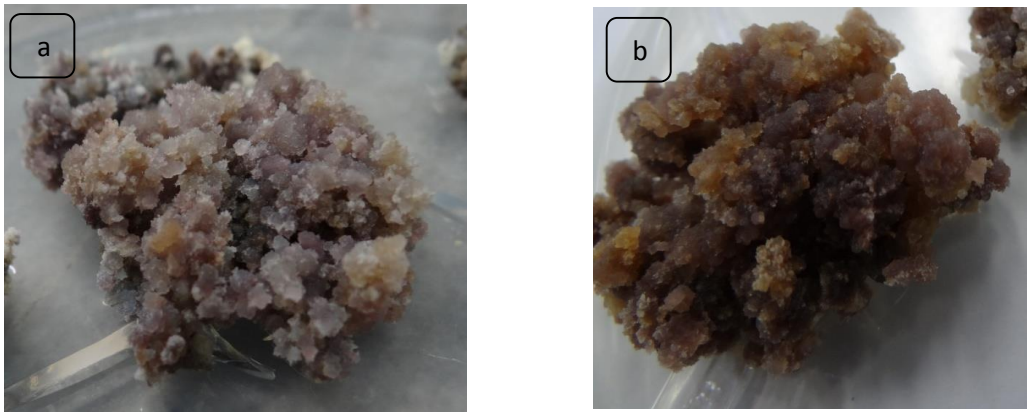
نتایج حاصل از مقایسه‌ی میانگین اثرات متقابل تیمارهای مختلف غلظت در زمان EMS نشان داد که افزایش غلظت و زمان کاربرد این ماده با کاهش در میزان صفات کالوس‌زایی در ریزنمونه‌های گز همراه بوده است. میزان زنده‌مانی ریزنمونه‌های گز در غلظت زیاد ماده جهش‌زای EMS به میزان بسیار زیاد، کاهش یافت. بیشترین میزان زنده‌مانی ریزنمونه در غلظت ۰/۲ درصد EMS و زمان ۳۰ دقیقه اعمال آن بعد از شاهد مشاهده گردید. حداکثر غلظت و زمان استفاده از EMS در ریزنمونه‌ها منجر به از بین رفتن آن‌ها گردید و مرگ کامل ریزنمونه‌ها را نتیجه داد. بیشترین میزان القای کالوس پس از شاهد، در تیمار غلظت ۰/۲ درصد EMS به‌مدت سی دقیقه صورت گرفت و تفاوت معنی‌دار را با سایر تیمارها ایجاد کرده است. در سایر تیمارهای اعمال EMS القای کالوس در حد صفر بود و اثر منفی افزایش غلظت و زمان کاربرد EMS بر کالوس‌زایی در گز را نشان داد و

ریزنمونه‌ها با وجود زنده‌مانی تحت تنش شدید حاصل از افزایش غلظت و زمان استفاده از EMS واکنش کالوس‌زایی در محیط کشت را نشان ندادند. حجم کالوس القایی نیز به‌طور مشابه با درصد القای کالوس تحت تاثیر افزایش غلظت و زمان اعمال EMS قرار گرفت و تنها در ریزنمونه‌های حاصل از تیمار غلظت ۰/۲ درصد و زمان سی دقیقه حجم کالوس مطلوب به‌دست آمده است (جدول ۳). افزایش غلظت و زمان کاربرد EMS با افزایش معنی‌دار میزان فنل در ریزنمونه‌ها همراه بوده است. بدین ترتیب که کمترین میزان ترشح فنل (۴/۰۱) در بین تیمارها پس از شاهد در غلظت ۰/۲ درصد و زمان سی دقیقه کاربرد EMS حاصل شد. بنابراین هر دو عامل افزایش غلظت و زمان کاربرد EMS اثر مشابه بر افزایش ترشح فنل داشت. از نظر مورفولوژیکی نیز کالوس‌های حاصل از اثر EMS بر ریزنمونه‌ها، کالوس‌های متفاوت از لحاظ شکل، نوع و رنگ بودند. این کالوس‌ها بافت فشرده‌تر و رنگ سفید تا خاکستری داشتند و مانند کالوس‌های شاهد، شفاف نبودند (شکل ۱).

جدول ۳: مقایسه‌ی میانگین اثرات متقابل غلظت به‌مدت EMS بر صفات القای کالوس و ترشح فنل در ریزنمونه‌های گز در شرایط درون‌شیشه‌ای

غلظت EMS (٪)	زمان اعمال EMS (دقیقه)	زنده‌مانی ریزنمونه (درجه‌بندی)	القای کالوس (درصد)	حجم کالوس (درجه‌بندی)	ترشح فنل (درجه‌بندی)
	۰	۱۰/۶۶^{a}	۹۳/۳۳^{a}	۳/۸۳^{a}	۰/۹۰^{a}
۰/۲	۳۰	۸/۰۰^{b}	۶۶/۶۶^{b}	۲/۸۳^{b}	۴/۰۱^{b}
	۶۰	۳/۳۳^{c}	۰/۰۰^{c}	۰/۰۰^{c}	۸/۰۶^{c}
	۰	۱۰/۶۶^{a}	۹۳/۳۳^{a}	۳/۸۳^{a}	۰/۹۰^{a}
۰/۴	۳۰	۱/۳۳^{d}	۰/۰۰^{c}	۰/۰۰^{c}	۸/۳۳^{c}
	۶۰	۱/۰۰^{d}	۰/۰۰^{c}	۰/۰۰^{c}	۹/۰۰^{c}

در هر ستون حروف مشابه تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال پنج درصد آزمون دانکن نشان ندادند.



شکل ۱: مقایسه‌ی بافت کالوس حاصل از a) ریزنمونه‌های تیمار شده با EMS با غلظت ۰/۲ درصد و b) ریزنمونه‌های تیمار نشده با EMS

در این آزمایش تیمار غلظت ۰/۲ درصد و زمان سی دقیقه اعمال EMS به‌عنوان تیمار مطلوب از نظر میزان زنده‌مانی و صفات القای کالوس به‌دست آمد. در این تیمار کمترین میزان اثر نامطلوب EMS بر این صفات در ریزنمونه‌ها مشاهده شد که احتمالاً به دلیل غلظت کم ماده جهش‌زا است که ترمیم ناشی از آسیب فیزیولوژیکی در مواد گیاهی راحت‌تر انجام می‌گیرد. به‌طور مشابه کاربرد کمترین غلظت و زمان EMS بر سلول‌های جنینی چغندر قند میزان زنده‌مانی و باززایی آن‌ها را در سطح قابل قبول گزارش کرده است (Wei *et al.*, 2014).

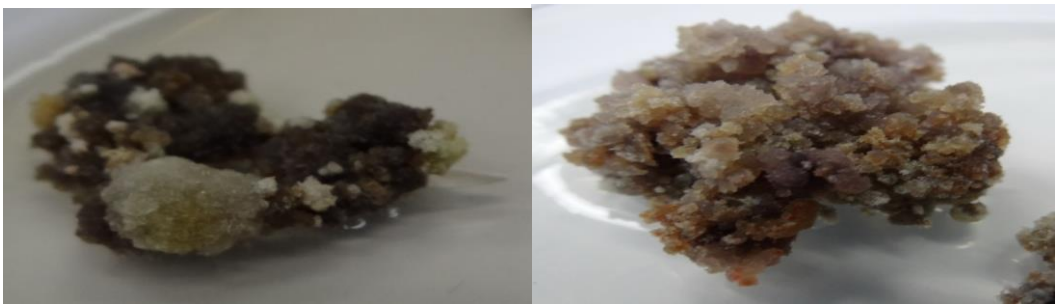
نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که با افزایش غلظت و زمان اعمال EMS میزان زنده‌مانی، درصد و حجم القای کالوس در ریزنمونه‌ها به‌شدت کاهش یافت. همچنین افزایش غلظت EMS بر ریزنمونه‌ها اثر بیشتر بر عدم زنده‌مانی ریزنمونه‌ها نسبت به افزایش زمان اعمال EMS نشان داد. زمان کوتاه اعمال EMS اجازه‌ی جذب میزان لازم از ماده جهش‌زا برای القای جهش را فراهم نمی‌کند. از طرف دیگر زمان‌های طولانی تماس به‌ویژه در غلظت‌های کم ماده جهش‌زا، شانس زنده‌مانی ماده‌ی گیاهی را فراهم می‌کند (Omar & Novak, 1990). هم‌سو با این نتایج افزایش غلظت و زمان کاربرد EMS در ریزنمونه‌های برگی گیاه دارویی *Asteracantha longifolia* کاهش میزان زنده‌مانی و باززایی را نشان داده است (Behera *et al.*, 2012). افزایش غلظت و زمان اعمال تیمار EMS بر کالوس برموداگرس با کاهش قطر و افزایش میزان نکروز شدن کالوس همراه بود (تقی‌زاده، ۱۳۹۰). ریزنمونه‌های گز تحت تیمار EMS افزایش ترشح فنل و سیاه شدن بافت را متناسب با غلظت و مدت زمان کاربرد EMS نشان دادند. به‌طور مشابه استفاده از تیمار EMS در سلول‌های جنینی نیشکر در غلظت‌های متفاوت، قهوه‌ای شدن مواد گیاهی را با افزایش غلظت EMS در محدوده ۰/۲- ۰/۰۵ درصد در زمان‌های مختلف نشان داده است (Wei *et al.*, 2014).

کاهش زمان انگیزش کالوس در ریزنمونه‌های تحت تیمار EMS به‌مدت سی دقیقه نسبت به شاهد دیده شد. نقش تحریکی EMS بر القای کالوس نیز ممکن است با اثر بر زمان فعال شدن سنتز پروتئین‌ها در ارتباط باشد. کاهش زنده‌مانی در ریزنمونه‌ها را می‌توان به اثر سمیت ژنی EMS بر توانمندی (Totipotency) و انعطاف‌پذیری (Plasticity) سلول‌ها در ریزنمونه ارتباط داد (Behera *et al.*, 2012). تماس مستقیم EMS با بافت و جنین‌های سوماتیکی، منجر به آسیب‌های فیزیولوژیکی شدید در ریزنمونه‌ها می‌گردد (Omar & Novak, 1990). ریزنمونه‌های تیمار شده با EMS، کالوس‌های متفاوت از لحاظ شکل، رنگ و ساختار نسبت به کالوس‌های حاصل از ریزنمونه‌های تیمار نشده با EMS ایجاد کردند. این کالوس‌ها اگرچه زمان انگیزش کمتری را نشان دادند ولی حجم کالوس کمتری را نیز نسبت به شاهد تولید کردند (شکل ۱). به‌طور مشابه کالوس‌های خرمای تیمار شده با EMS اثر نامطلوب بر نمو جنین را نشان داده است (Omar & Novak, 1990). ساختار این کالوس‌های تحت تیمار EMS گرانوله‌تر بود و بافت آبکی کمتری نسبت به کالوس‌های شاهد داشتند. به‌علاوه در این کالوس‌ها نقاط رنگی موجود در کالوس‌های شاهد دیده نشد و نقاط سبز رنگ حاوی کلروفیل نیز در این کالوس‌ها وجود نداشت (شکل ۱). تغییر در رنگ برگ‌ها در اغلب

تیمارهای جهش‌زا رایج است (Alcantara *et al.*, 1996). EMS می‌تواند جهش‌هایی مانند جهش‌های کلروفیلی در گیاهان ایجاد کند که مستقیماً به مدت زمان تماس EMS با بافت در یک غلظت خاص بستگی دارند (Kim *et al.*, 2006).

ازمایش سوم- بررسی میزان مقاومت و پالایش گز در مرحله‌ی کالوس نسبت به کادمیوم

کالوس‌های حاصل از ریزنمونه‌های تیمار نشده با EMS در محیط کشت دارای کادمیوم با همان بافت و رنگ به رشد خود ادامه دادند. در صورتی‌که کالوس‌های حاصل از ریزنمونه‌های تیمار شده با EMS در محیط دارای کادمیوم به‌ویژه در غلظت‌های بالا ابتدا ترشح فنل زیاد را نشان دادند که در خود بافت کالوس تجمع یافتند و تا حدی سیاه‌شدن کالوس را موجب شد و بخشی از بافت کالوس‌های قبلی از بین رفت. اما پس از گذشت دو هفته کالوس‌های سفید، شیری تا خاکستری رنگ با بافت متراکم روی کالوس‌ها شروع به رشد کرد و ماهیت بافت و رنگ کالوس بسیار تغییر کرد. این کالوس‌ها فشرده و غیر آب‌دار بودند و نسبت وزنی بیشتری را نسبت به بافت آب‌دار کالوس‌های حاصل از ریزنمونه‌های تیمار نشده با EMS ایجاد نمودند. همچنین کالوس‌های حاصل از ریزنمونه‌های تیمار نشده با EMS نقاط قهوه‌ای قرمز رنگ در محیط دارای کادمیوم داشتند در صورتی‌که این مورد در کالوس‌های حاصل از ریزنمونه‌های تیمار شده با EMS دیده نشد (شکل۲).



شکل ۲: بافت کالوس در محیط کشت دارای کادمیوم ۲۰ میلی‌گرم در لیتر حاصل از ریزنمونه‌های تیمارشده با EMS (سمت چپ) و حاصل از ریزنمونه‌های تیمار نشده با EMS (سمت راست)

بررسی اثرات متقابل کاربرد EMS در غلظت کادمیوم نشان داد که کالوس‌های حاصل از تیمار EMS، وزن خشک بیشتر با تفاوت معنی‌دار در غلظت‌های ۱۰ و ۲۰ میلی‌گرم در لیتر کادمیوم را نسبت به کالوس‌های حاصل از ریزنمونه‌های تیمارنشده با EMS نشان دادند اما وزن خشک آن‌ها در محیط بدون کادمیوم و غلظت ۴۰ میلی‌گرم در لیتر تفاوت معنی‌دار ایجاد نکرد. افزایش غلظت کادمیوم همبستگی مثبت با میزان نشت یونی در هر دو نوع کالوس داشت. بیشترین میزان نشت یونی در غلظت ۴۰ میلی‌گرم در لیتر کادمیوم در ریزنمونه های تیمارنشده با EMS (۷۳/۹۵ درصد) به‌دست آمد که تفاوت معنی‌دار نسبت به سایر تیمارها نشان داد. نشت یونی در کالوس حاصل از ریزنمونه‌های تیمارشده با EMS در غلظت ۴۰ میلی‌گرم در لیتر کادمیوم

(۵۴/۸۵) به‌طور معنی‌داری کمتر از کالوس‌های تیمار نشده با EMS در همین غلظت به‌دست آمد. میزان تجمع کادمیوم در بافت کالوس گز در ریزنمونه‌های تیمار نشده با EMS، روند افزایشی تجمع کادمیوم با افزایش غلظت کادمیوم در محیط کشت را نشان داد. بیشترین میزان جذب کادمیوم در تیمار ۴۰ میلی‌گرم در لیتر کادمیوم با ریزنمونه‌های تیمار نشده با EMS (۱۰۵۳/۵۶ قسمت در میلیون) و پس از آن ریزنمونه‌های تیمار شده با EMS در محیط کشتی با همین غلظت کادمیوم (۹۲۳/۰۹) به‌دست آمد. در این آزمایش بیشترین میزان فاکتور تجمع زیستی در ریزنمونه‌های تیمار نشده با EMS به‌دست آمد که البته تفاوت معنی‌دار با ریزنمونه‌های تیمار شده با EMS در غلظت‌های ۱۰ و ۴۰ میلی‌گرم در لیتر کادمیوم را نشان نداد. ریزنمونه‌های تیمار نشده با EMS در محیط‌های ۱۰و۲۰ میلی‌گرم در لیتر کادمیوم و ریزنمونه‌های تیمار شده با EMS در محیط ۲۰ میلی‌گرم در لیتر کادمیوم به‌طور مشابه کمترین سطح فاکتور تجمع را نشان داده‌اند. به‌طورکلی بر اساس نتایج به‌دست آمده از اثر غلظت‌های مختلف کادمیوم بر صفات رشدی هر دو نوع کالوس تیمارشده با EMS و تیمارنشده با EMS، مهار رشدی کالوس در معرض کادمیوم را وابسته به غلظت نشان داد (جدول ۴).

جدول ۴: مقایسه‌ی میانگین اثرات متقابل اعمال EMS و غلظت‌های کادمیوم بر ویژگی‌های رشدی کالوس و تجمع کادمیوم

اعمال EMS	غلظت کادمیوم (میلی‌گرم در لیتر)	وزن خشک (گرم)	نشت یونی (درصد)	میزان تجمع کادمیوم (میلی‌گرم در کیلوگرم ماده خشک)	فاکتور تجمع زیستی
کالوس حاصل از ریزنمونه تیمارنشده با EMS	صفر	۰/۵۰^{cd}	۴۲/۳۲^{a}	۸/۴۶^{e}	-
	۱۰	۰/۵۴^{bc}	۴۴/۱۹^{ab}	۱۲۶/۴۶^{de}	۱۲/۶۴^{b}
	۲۰	۰/۵۲^{c}	۴۹/۷۳^{c}	۲۲۳/۲۲^{cd}	۱۱/۱۶^{b}
	۴۰	۰/۳۱^{e}	۷۳/۹۵^{e}	۱۰۵۳/۵۶^{a}	۲۶/۳۳^{a}
کالوس حاصل از ریزنمونه تیمارشده با EMS	صفر	۰/۶۰^{bc}	۴۳/۵۵^{a}	۱۰/۰۵^{e}	-
	۱۰	۰/۹۲^{a}	۴۷/۰۲^{bc}	۲۵۴/۰۵^{c}	۲۵/۴۰^{a}
	۲۰	۰/۶۸^{b}	۴۹/۵۱^{c}	۲۰۳/۲۱^{cd}	۱۰/۱۶^{b}
	۴۰	۰/۳۷^{de}	۵۴/۸۵^{d}	۹۲۳/۰۹^{b}	۲۳/۰۷^{a}

در هر ستون حروف مشابه تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال پنج درصد آزمون دانکن نشان ندادند.

تحت شرایط تنش غلظت کم کادمیوم، افزایش میزان اکثر صفات رشدی مانند حجم، وزن تر و خشک و رشد نسبی نسبت به شاهد دیده شد و بیشترین اثر تحریکی در کالوس‌های تحت تیمار غلظت ۱۰میلی‌گرم در لیتر مشاهده شد. القای اثر تحریکی کادمیوم در غلظت کم بر میزان وزن خشک در مطالعه‌ی اثر این فلز در کشت سلولی سویا گزارش شده است (Sobkowiak *et al.*, 2004). کاهش میزان رشد تنها در غلظت‌های زیاد کادمیوم، نشان‌دهنده‌ی توانایی گیاه در حفظ و بقای

خود در یک سطح معین از تنش فلز کادمیوم بوده است. در این آزمایش غلظت ۲۰ میلی‌گرم در لیتر کادمیوم اگرچه اثر تحریکی معنی‌دار در صفات رشدی کالوس‌ها ایجاد نکرد اما در صفات وزن خشک، تر و میزان رشد نسبی، میزانی مشابه با سطح شاهد را نشان داد. به‌طور مشابه غلظت‌های کم سرب (صفر الی چهل میلی‌گرم در لیتر) اثر مثبت بر رشد کالوس برموداگرس را نشان داد (تقی‌زاده، ۱۳۹۰). غلظت ۱۰ میلی‌گرم در لیتر کادمیوم در کالوس طاووسی (*Spartium junceum*) تفاوت معنی‌دار در وزن خشک کالوس ایجاد نکرد (گنجی، ۱۳۹۵). غلظت ۴۰ میلی‌گرم در لیتر کادمیوم نشان داد که حضور این میزان از فلز برای القای اثر بازدارندگی رشد کالوس‌های گز کافی است. کاهش قابل توجه در حجم، وزن تر و خشک کالوس، میزان رشد نسبی و شاخص تحمل تنش در این غلظت از کادمیوم در کالوس‌های گز حاصل شد و تا حد زیادی منجر به از بین رفتن کالوس‌ها گردید. حداقل میزان این صفات در این غلظت کادمیوم با ترشح بالای فنل، نشت یونی و آسیب تنش‌های اکسیداتیو حاصل از حضور کادمیوم درمحیط در ارتباط است که در این غلظت به بالاترین میزان رسید و در کالوس‌ها به‌میزان بسیار زیاد سیاه شدن بافت را ایجاد نمود. هر چند برخی از کالوس‌ها نیز مجدداً شروع به احیا کردند و رشد بسیار کمی را نشان دادند ولی میزان رشد ناکافی بود. در غلظت‌های زیاد کادمیوم، کاهش رشد کالوس همبستگی مثبت با تجمع بالای این فلز توسط کالوس داشته است. کمترین میزان وزن تر کالوس طاووسی در غلظت ۴۰ میلی‌گرم در لیتر کادمیوم دیده شد (گنجی، ۱۳۹۵). قرارگیری کالوس برموداگرس در معرض تنش فلز سرب تا غلظت صد میلی‌گرم در لیتر کاهش رشد کالوس‌ها را نشان داد (تقی‌زاده، ۱۳۹۵). انواع مختلفی از سازوکارها برای توضیح اثر تحریکی فلزات پیشنهاد شده است که یکی از این سازوکارها عمل یون‌های فلزی به‌عنوان فعال‌کننده آنزیم‌های دخیل در سوخت‌وساز سایتوکینین‌ها است که رشد گیاهان را تسریع می‌کند (Nyitrai *et al.*, 2003). افزایش غلظت فلزات سنگین همچنین بر تجمع و انتقال عناصر ضروری برای گیاه اثر گذار است (Kabata-Pendias, 2010). کاهش میزان رشد در گیاهان در معرض غلظت‌های مختلف فلزات سنگین، اغلب در نتیجه اثرات مستقیم (سمیت تجمع فلزات سنگین در بافت‌ها) و یا غیرمستقیم (محدود کردن تامین آب و مواد غذایی) رخ می‌دهد (Nedjimi & Daoud, 2009). گیاه گز تا غلظت بیست میلی‌گرم در لیتر کادمیوم توانایی مطلوب در کنترل این تنش را نشان داد، ولی در غلظت‌های بالاتر این سیستم‌های دفاعی تحت تاثیر سمیت یون‌های کادمیوم سرکوب شدند و کارآیی لازم را نداشتند.

ترشح فنل با افزایش غلظت کادمیوم در محیط کشت کالوس گز رابطه مستقیم داشت. محیط کشت دارای ۴۰میلی‌گرم در لیتر کادمیوم با سیاه شدن و تقریباً از بین رفتن کالوس‌ها همراه بود. قهوه‌ای شدن کالوس آفتابگردان (*Helianthus annuus*) در غلظت زیاد کادمیوم و تجمع مواد فنلی محلول در سیتوپلاسم ریشه کاج اسکاتلندی (*Pinus sylvestris*) تیمار شده با غلظت پنجاه میکرومولار کادمیوم در سیستم کشت هیدروپونیک، گزارش شده است (Azevedo *et al.*, 2005). قهوه‌ای شدن و مرگ کامل کالوس طاووسی در معرض غلظت کادمیوم ۴۰ میلی‌گرم در لیتر ایجاد شد (گنجی، ۱۳۹۵). تجمع ترکیبات ثانویه با رشد سلول رابطه‌ی عکس دارد (Castro *et al.*, 2016). کادمیوم به عنوان تنش‌زا، یک عامل تنش قوی و القای ایجاد گونه‌های فعال

اکسیژن در گیاهان شناخته شده است (Seregin & Ivanov, 2001). کادمیوم با ایفای نقش واسطه‌ای در فعال‌سازی آنزیم لیپوکسی‌ژناز (LOX) که منجر به تشکیل هیدروپراکسیدازهای لیپیدی می‌گردد، اختلال در فعالیت غشایی را موجب می‌شود. بنابراین در غلظت‌های زیاد کادمیوم، میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و آسکوربات کاهش می‌یابد و در ضمن، تخریب غشای سلولی و اندامک‌ها در نتیجه تنش اکسیداتیو شدید رخ می‌دهد (Shekhawat *et al.*, 2010) و ترشح بیشتر مواد فنلی در بافت، با افزایش نشت یونی، اکسیده شدن این ترکیبات و سیاه شدن کالوس‌ها را موجب می‌شود. از آن‌جا که کالوس‌های حاصل از تیمار EMS تحمل بیشتر نسبت به تخریب و نشت یونی در برابر غلظت‌های زیاد کادمیوم نشان دادند، ترشح فنل کمتری نیز در آن‌ها دیده شد. در این آزمایش وزن خشک بیشتری در کالوس‌های حاصل از تیمار EMS درحضور کادمیوم در مقایسه با کالوس‌های حاصل از ریزنمونه‌های تیمارنشده با EMS به‌دست آمد. در واقع بیشترین میزان وزن خشک کالوس در نمونه‌های تیمارشده با EMS در غلظت ۱۰میلی‌گرم در لیتر کادمیوم حاصل شد. به‌طور کلی کالوس حاصل از ریزنمونه‌های تیمارشده با EMS در مواجهه با شرایط تنش کادمیوم صفات رشدی مطلوب‌تری را نسبت به کالوس‌های تیمارنشده با EMS نشان دادند. بنابراین می‌توان گفت احتمالاً اثر EMS در ریزنمونه‌های گز در جهت تقویت و تحریک سازوکارهای دفاعی گیاه گز به‌گونه‌ای پیش رفته است که منجر به کاهش آسیب‌های فلز سنگین و در نتیجه افزایش معنی‌دار وزن خشک کالوس و سایر فاکتورهای رشدی نسبت به ریزنمونه‌های تیمارنشده با EMS گردید. بدین ترتیب با توجه به افزایش در صفات رشدی، تجمع کادمیوم و فاکتور تجمع زیستی در کالوس حاصل از ریزنمونه‌های تیمار EMS شاید بتوان رخ دادن جهش در ریزنمونه‌های تیمار شده با EMS را احتمال داد. مشابه با این نتایج، گیاهچه‌های داوودی باززایی شده از تیمار EMS ویژگی‌های متفاوت رشدی را نشان داده‌اند (Schum & Preil, 1998). افزایش میزان نشت یونی در هر دو نوع کالوس مورد ارزیابی در این آزمایش به‌دست آمد. به‌طور مشابه در ذرت افزایش غلظت کادمیوم افزایش نشت یونی را در گیاهچه‌ها موجب شده است (Hussain *et al.*, 2013b). آسیب غشای سلولی، القای تنش اکسیداتیو و بنابراین افزایش میزان نشت یونی وابسته به غلظت کادمیوم در گیاهان نشان داده شده است (Cui & Wang, 2006).

شاخص تحمل تنش، فاکتوری برای ارزیابی میزان رشد گیاه در محیط دارای فلزات سنگین می‌باشد. این فاکتور در کالوس‌های گز وابسته به غلظت کادمیوم بود و در ریزنمونه‌های تیمار شده با EMS نیز میزان بیشتری را نشان داد. مشابه با این نتایج، در کشت کالوس درخت *Sesbania drummondii* قادر به تحمل غلظت کم کادمیوم است و در غلظت بیشتر کاهش میزان رشد و شاخص تحمل را نشان داده‌اند (Israr *et a*l., 2006). در کالوس‌های گز تیمار شده با غلظت‌های مختلف کادمیوم نقاط قرمز رنگ به‌ویژه در غلظت‌های بالاتر به‌وضوح مشاهده شد. درکشت کالوس‌های نیشکر در غلظت‌های مختلف کادمیوم به‌ویژه در غلظت‌های بیشتر، وجود نقاط قهوه‌ای قرمز رنگ در کالوس را گزارش کرده‌اند (Fornazier *et al.*, 2002). پروتئین IRT1 به‌عنوان انتقال‌دهنده آهن، منگنز و روی در گیاهان شناخته شده است که کادمیوم می‌تواند جذب این عناصر را از طریق این پروتئین

مختل نماید (Korshunova *et al.*, 1999). کادمیوم یکی از خطرناک‌ترین آلاینده‌های محیطی است که به‌آسانی با آهن که یکی از عناصر بسیار مهم در رشد و متابولیسم گیاهی می‌باشد تقابل دارد. بنابراین علائم کلروزه شدن بافت به‌دلیل کمبود آهن در نتیجه رقابت این عنصر با کادمیوم برای اشغال مکان‌های غشایی دیده می‌شود (Siedlecka & Krupa, 1999). همچنین رنگ قهوه‌ای مایل به قرمز می‌تواند در نتیجه اکسیده شدن ترکیبات سلولی به‌دلیل قرار رفتن در معرض کادمیوم یا حتی تشکیل آنتوسیانین باشد (Fornazier *et al.*, 2002).

میزان تجمع کادمیوم در بافت کالوس‌های گز با غلظت کادمیوم همبستگی مثبت داشت؛ به‌نحوی‌که بیشترین میزان تجمع در ریزنمونه‌های تیمار نشده با EMS در غلظت ۴۰ میلی‌گرم در لیتر کادمیوم به‌دست آمد؛ اگرچه کالوس‌ها شاخص تحمل کمتر و بیشترین میزان نشت یونی را در این غلظت نشان دادند. میزان تجمع کادمیوم در کشت کالوس گلرنگ (Namjooyan *et al.*, 2012) و کشت سلولی کاج (Thangavel *et al.*, 2007) وابسته به غلظت و در بافت‌های برگی گیاه دارویی سیلن وابسته به غلظت و زمان قرارگیری گیاهان در معرض تنش کادمیوم گزارش گردید (Vitória, 2001). کالوس گلرنگ میزان تجمع ۳۳۴ میلی‌گرم کادمیوم در کیلوگرم ماده خشک را در محیط کشت دارای صد میکرومولار کادمیوم نشان داد (Namjooyan *et al.*, 2012). کالوس طاووسی، تجمع وابسته به غلظت کادمیوم را با حداکثر جذب ۷۹۱ میلی‌گرم در لیتر کادمیوم ایجاد کرد (گنجی، ۱۳۹۵). این مطالعه نشان داد هر دو نوع کالوس حاصل از ریزنمونه‌های گز به تنش فلز کادمیوم در غلظت‌های کم مقاوم است و این عنصر را در بافت، بدون نشان دادن کاهش رشدی معنی‌دار در طی دوره ۴۵ روزه ذخیره کرد. گیاهان فراانباشت‌گر فلز کادمیوم مناسب برای اهداف گیاه‌پالایی، باید بیش از ۱۰۰ میلی‌گرم کادمیوم در کیلوگرم وزن خشک را ذخیره نمایند و نسبت فلز سنگین ذخیره شده در شاخساره به ریشه بیشتر از یک باشد (Lutts *et al.*, 2004). میزان تجمع کادمیوم در کالوس گز با توجه به غلظت مورد استفاده در محیط کشت در محدوده ۱۰۵۳- ۱۲۶ میلی‌گرم در لیتر در غلظت‌های مختلف کادمیوم در محیط کشت اندازه‌گیری شد؛ بنابراین احتمالاً این گیاه را می‌توان از گیاهان فراانباشت‌گر کادمیوم معرفی کرد. از طرف دیگر میزان تجمع در کالوس‌های حاصل از تیمار EMS نسبت به کالوس‌های حاصل از ریزنمونه‌های تیمار نشده با EMS و به‌ویژه در تیمار غلظت ده میلی‌گرم در لیتر کادمیوم بیشتری به‌دست آمد. کالوس این گیاه علائم سمیت قابل مشاهده را تنها در برابر تنش کادمیوم شدید نشان داد. ضمن این‌که حداکثر میزان تجمع کادمیوم موجود در بافت با بیش از ۱۰۵۳/۵۶ میلی‌گرم در کیلوگرم وزن خشک کالوس گز در غلظت ۴۰ میلی‌گرم در لیتر کادمیوم به‌دست آمد. به‌این ترتیب می‌توان گفت این گیاه با جذب کادمیوم در غلظت مناسب و تولید زیست‌توده‌ی بالا می‌تواند در فرآیندهای گیاه‌پالایی مورد استفاده قرار گیرد. در کالوس‌های گز میزان نسبی آب موجود در بافت تحت تاثیر تیمار غلظت‌های مختلف کادمیوم قرار نگرفت. مشابه با این نتایج گیاهچه‌های گز تیمار شده با سرب در غلظت‌های مختلف اختلاف معنی‌دار در محتوای نسبی آب نشان ندادند؛ بنابراین سمیت فلزات منجر به القای تنش آبی ثانویه حداقل در طی دوره آزمایش نشده است (Manousaki *et al.*, 2009). نشت یونی نیز به‌طور مستقیم تحت تاثیر

شدت تنش فلزات سنگین در کالوس گز قرار گرفت. این نتایج می‌تواند با تخریب غشایی تنش اکسیداتیو در ارتباط باشد؛ زمانی‌که سلول قادر به مهار تنش اکسیداتیو نباشد تخریب غشایی رخ می‌دهد و با افزایش نشت املاح/الکترولیت همراه است (Azevedo *et al.*, 2005). کالوس گز بیشترین میزان فاکتور تجمع زیستی را در غلظت ۴۰ میلی‌گرم در لیتر کادمیوم در هر دو نوع ریزنمونه تیمار شده و تیمار نشده با EMS (به‌ترتیب ۲۳ و۲۶) و غلظت ۱۰میلی‌گرم در لیتر با ریزنمونه‌های تیمارشده با EMS (۲۵/۴۰) نشان داد. در صنوبر میزان فاکتور تجمع زیستی وابسته به نوع کلون و غلظت گزارش شده است (Zacchini *et al.*, 2009). کاهش میزان فاکتور تجمع زیستی در ریزنمونه‌های تحت تیمار کادمیوم را می‌توان به توانایی حفظ ورود و جریان فلز توسط سلول نسبت داد و همین‌طور به‌دلیل افزایش میزان فاکتور تجمع زیستی در نتیجه اختلال در قابلیت و عملکرد غشای سلولی دانست (Iori *et al.*, 2012) که میزان نشت یونی و کاهش رشد در کالوس گز در تیمارهای با غلظت زیاد کادمیوم را نشان می‌دهد. در کالوس‌های حاصل از تیمار EMS در غلظت ده میلی‌گرم در لیتر کادمیوم احتمالاً جهش در جهت افزایش القای سازوکارهای دفاعی گیاه و جذب و تجمع کادمیوم در بافت بدون نشان دادن اثرات نامطلوب صورت گرفت.

نتیجه‌گیری کلی

بر اساس نتایج به‌دست آمده می‌توان گفت گزینش درون‌شیشه‌ای کالوس‌های گز، ابزار مناسبی در گزینش لاین‌های اصلاح شده در مقاومت به کادمیوم بود. به‌طور کلی نتایج نشان داده است که کالوس *T. aphylla* با تجمع بیش از ۱۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم کادمیوم در بافت، به همراه تحریک رشدی و زنده‌مانی مطلوب در شرایط درون شیشه‌ای، به احتمال زیاد به‌عنوان یک گیاه فراانباشت‌گر کادمیوم ارزیابی می‌شود. علاوه بر این میزان زیست‌توده‌ی زیاد، گستردگی و عمق زیاد ریشه در این گیاه نیز می‌تواند آن را به‌عنوان یک گزینه‌ی مناسب جهت گیاه‌پالایی معرفی نماید. در این تحقیق همچنین کالوس‌های حاصل از ریزنمونه‌های تیمار شده با EMS در محیط کشت دارای ۱۰میلی‌گرم بر لیتر کادمیوم با تجمع دو برابری کادمیوم نسبت به کالوس‌های حاصل از ریزنمونه‌های تیمار نشده با EMS و نیز افزایش مقاومت نسبت به حضور کادمیوم، احتمالاً کارآیی مطلوب استفاده از اصلاح جهشی در ایجاد لاین‌های مقاوم به فلزات سنگین و افزایش ظرفیت انباشت کادمیوم در گیاه گز را نشان دادند.

سپاسگزاری

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

منابع

گنجی، م. (۱۳۹۵). توانایی ماده جهش‌زایEMS در مقاومت و پالایندگی درختچه زینتی طاووسی نسبت به کادمیوم. پایان‌نامه کارشناسی ارشد در رشته علوم باغبانی دانشگاه اراک، ۲۱۱ ص.

تقی‌زاده، م. (۱۳۹۰). ارزیابی قابلیت چمن در گیاه‌پالایی سرب، القای درون‌شیشه‌ای و ردیابی مولکولی آن. رساله دریافت درجه دکتری در رشته علوم باغبانی دانشگاه تهران، ۲۱۰ ص.

تقی زاده، م.، سلگی م. و شهرجردی ا. (۱۳۹۵). بررسی اثرات ضد میکروبی برخی ترکیبات اسانسی جهت گندزدایی سطحی ریزنمونه‌های توت فرنگی. زیست فناوری گیاهان دارویی، ۳: ص ۲۱-۱۰.

Al-Khayri, J. and Al-Bahrany, A. (2004). Growth, water content, and proline accumulation in drought-stressed callus of date palm. Biologia Plantarum, 48: 105-108.

Azevedo, H., Glória Pinto, C.G. and Santos, C. (2005). Cadmium effects in sunflower: membrane permeability and changes in catalase and peroxidase activity in leaves and calluses. Journal of plant nutrition, 28: 2233-2241.

Behera, M., Panigrahi, J., Mishra, R.R. and Rath, S.P. (2012). Analysis of EMS induced in vitro mutants of Asteracantha longifolia(L.) Nees using RAPD markers. Indian Journal of Biotechnology, 11: 39-47.

Castro, A.H.F., Braga, K.D.Q., Sousa, F.M.D., Coimbra, M.C. and Chagas, R.C.R. (2016). Callus induction and bioactive phenolic compounds production from Byrsonima verbascifolia (L.) DC.(Malpighiaceae). Revista Ciência Agronômica, 47: 143-151.

Clemens, S. and Ma, J.F. (2016). Toxic Heavy Metal and Metalloid Accumulation in Crop Plants and Foods. Annual review of plant biology, 67: 489-512.

Cui, Y. and Wang, Q. (2006). Physiological responses of maize to elemental sulphur and cadmium stress. Plant Soil and Environment, 52: 523-529.

Errabii, T., Gandonou, C.B., Essalmani, H., Abrini, J., Idaomar, M. and Skali-Senhaji, N. (2006). Growth, proline and ion accumulation in sugarcane callus cultures under drought-induced osmotic stress and its subsequent relief. African Journal of Biotechnology, 5: 1488-1493.

Fornazier, R.F., Ferreira, R.R., Pereira, G.J., Molina, S.M. and Smith, R.J., Lea, P.J. and Azevedo, R.A. (2002). Cadmium stress in sugar cane callus cultures: effect on antioxidant enzymes. Plant Cell, Tissue And Organ Culture, 71: 125-131.

Hagemeyer, J. and Waisel, Y. (1988). Excretion of ions (Cd2+, Li+, Na+ and Cl−) by Tamarix aphylla. Physiologia Plantarum, 73: 541-546.

Hoque, M.E. and Mansfield, J.W. (2004). Effect of genotype and explant age on callus induction and subsequent plant regeneration from root-derived callus of Indica rice genotypes. Plant cell, tissue and organ culture, 78: 217-23.

Hussain, I., Akhtar, S., Ashraf, M.A., Rasheed, R., Siddiqi, E.H. and Ibrahim, M. (2013). Response of maize seedlings to cadmium application after different time intervals. Hindawi P ublishing Corporation Agronomy, 2013: 1-9.

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. and Jain, J. (2006). Cadmium accumulation and antioxidative responses in the Sesbania drummondii callus. Archives of environmental contamination and toxicology, 50: 121-127.

Kabata-Pendias, A. (2010). Trace elements in soils and plants. Taylor& Francis Group, New York,CRC press, 507.

Kadukova, J., Manousaki, E. and Kalogerakis, N. (2008). Pb and Cd accumulation and phyto-excretion by salt cedar (Tamarix smyrnensis Bunge). International journal of Phytoremediation, 10: 31-46.

Kim, Y., Schumaker, K.S. and Zhu, J.K. (2006). EMS mutagenesis of Arabidopsis. Arabidopsis Protocols, 101-103.

Knasmüller, S., Gottmann, E., Steinkellner, H., Fomin, A., Pickl, C., Paschke, A., God, R. and Kundi, M. (1998). Detection of genotoxic effects of heavy metal contaminated soils with plant bioassays. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, 420: 37-48.

Korshunova, Y.O., Eide, D., Clark, W.G., Guerinot, M.L. and Pakrasi, H.B. (1999). The IRT1 protein from Arabidopsis thaliana is a metal transporter with a broad substrate range. Plant molecular biology, 40: 37-44.

Lutts, S., Lefèvre, I., Delpérée, C., Kivits, S. and Dechamps, C., Robledo, A. and Correal, E. (2004). Heavy metal accumulation by the halophyte species Mediterranean saltbush. Journal of Environmental Quality, 33: 1271-1279.

Ma, H., Tian, C., Feng, G. and Yuan, J. (2011). Ability of multicellular salt glands in Tamarix species to secrete Na+ and K+ selectively. Science China Life Sciences, 54: 282-289.

Manousaki, E., Kadukova, J., Papadantonakis, N. and Kalogerakis, N. (2008). Phytoextraction and phytoexcretion of Cd by the leaves of Tamarix smyrnensis growing on contaminated non-saline and saline soils. Environmental Research, 106: 326-332.

Manousaki, E., Kokkali, F. and Kalogerakis, N. (2009). Influence of salinity on lead and cadmium accumulation by the salt cedar (Tamarix smyrnensis Bunge). journal of chemical technology and biotechnology, 84: 877–883.

Nagajyoti, P., Lee, K., and Sreekanth, T. (2010). Heavy metals, occurrence and toxicity for plants: a review. Environmental Chemistry Letters, 8: 199-216.

Namjooyan, S., Khavarinejad, R., Bernard, F., Namdjoyan, S. and Piri, H. (2012). The effect of cadmium on growth and antioxidant responses in the safflower (Carthamus tinctorius L.) callus. Turkish Journal Of Agriculture And Forestry, 36: 145-152.

Nedjimi, B. and Daoud, Y. (2009). Cadmium accumulation in Atriplex halimus subsp .schweinfurthii and its influence on growth, proline, root hydraulic conductivity and nutrient uptake. Flora-Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants, 204: 316-324.

Nehnevajova, E., Herzig, R., Erismann, K.H. and Schwitzguébel, J.P. (2007). In vitro breeding of Brassica juncea L. to enhance metal accumulation and extraction properties. Plant Cell Reports, 26: 429-437.

North, J., Ndakidemi, P. and Laubscher, C. (2012). Effects of antioxidants, plant growth regulators and wounding on phenolic compound excretion during micropropagation of Strelitzia reginae. International Journal of Physical Sciences, 7: 638-646.

Nyitrai, P., Bóka, K., Gáspár, L., Sárvári, É., Lenti, K. and Keresztes, Á. (2003). Characterization of the stimulating effect of low-dose stressors in maize and bean seedlings. Journal of Plant Physiology, 160: 1175-1183.

Omar, M. and Novak, F. (1990). In vitro plant regeneration and ethylmethanesulphonate (EMS) uptake in somatic embryos of date palm (Phoenix dactylifera L.). Plant cell, tissue and organ culture, 20: 185-190.

Patade, V.Y., Suprasanna, P. and Bapat, V. (2008). Gamma irradiation of embryogenic callus cultures and in vitro selection for salt tolerance in sugarcane (Saccharum officinarum L.). Agricultural Sciences in China, 7: 1147-1152.

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.

Schum, A. and Preil, W. (1998). Induced mutations in ornamental plants. In Somaclonal variation and induced mutations in crop improvement, Kluwer Academic publisher, Dordrecht, Springer, 333-366.

Seregin, I. and Ivanov, V. (2001). Physiological aspects of cadmium and lead toxic effects on higher plants. Russian Journal of Plant Physiology, 48: 523-544.

Sharma, A., Bhansali, S. and Kumar, A. (2013). In vitro callus induction and shoot regeneration in Eclipta alba (L.), Hassk. International Journal of Life Science & Pharma Research, 3: 43-46.

Shekhawat, G.S., Verma, K., Jana, S., Singh, K., Teotia, P. and Prasad, A. (2010). In vitro biochemical evaluation of cadmium tolerance mechanism in callus and seedlings of Brassica juncea. Protoplasma, 239: 31-38.

Shu, Q., Forster, B.P., Nakagawa, H. and Nakagawa, H. (2012). Plant mutation breeding and biotechnology. CAB International and FAO, 591.

Siedlecka, A. and Krupa, Z. (1999). Cd/Fe interaction in higher plants-its consequences for the photosynthetic apparatus. Photosynthetica, 36: 321-331.

Sobkowiak, R., Rymer, K., Rucinska, R. and Deckert, J. (2004). Cadmium-induced changes in antioxidant enzymes in suspension culture of soybean cells. Acta Bioghimica Polonica-English Edition, 51: 219-222.

Soudek, P., Petrová, Š. and Vaněk, T. (2011). Heavy metal uptake and stress responses of hydroponically cultivated garlic (Allium sativum L.). Environmental and experimental botany, 74: 289-295.

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.

Thangavel, P., Long, S. and Minocha, R. (2007). Changes in phytochelatins and their biosynthetic intermediates in red spruce (Picea rubens Sarg.) cell suspension cultures under cadmium and zinc stress. Plant cell, tissue and organ culture, 88: 201-216.

Vitória, A.P., Lea, P.J. and Azevedo, R.A. (2001). Antioxidant enzymes responses to cadmium in radish tissues. Phytochemistry, 57: 701-710.

Wei, P., Zhi, J., Qin, L., Cen, X., Zhu, H. and Zhou, F. (2014). Effects of EMS Treatments on Multiplication and Differentiation of Sugarcane Embryonic Cell Clusters. Agricultural Biotechnology, 3: 40-43.

Yang, X., Long, X. ,Ni, W. and Fu, C. (2002). Sedum alfredii H: a new Zn hyperaccumulating plant first found in China. Chinese Science Bulletin, 47: 1634-1637.

Zacchini, M., Pietrini, F., Mugnozza, G.S., Iori, V., Pietrosanti, L. and Massacci, A. (2009). Metal tolerance, accumulation and translocation in poplar and willow clones treated with cadmium in hydroponics. Water, Air, and Soil Pollution, 197: 23-34.

Zhang, X.C., Millet, Y., Ausubel, F.M. and Borowsky, M. (2014). Next-Gen Sequencing-Based Mapping and Identification of Ethyl Methanesulfonate-Induced Mutations in Arabidopsis thaliana. In Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc., 4648.

In vitro mutation breeding of *Tamarix aphylla* to increas Cd tolerance and accumulation

P. Karimi[1], M. Taghizadeh[2]*, M. Solgi [3]

Received:2018.2.3
Accepted:2019.11.9

Abstract

Phytoremediation as a cost-effective and environmentalist friendly technique used to eliminate polluted soils with heavy metals contamination. The present study was aimed to evaluate the resistance and remediation of *Tamarix aphylla* calli treated by in vitro mutagenic agent; with EMS. At the first step, optimizing of callus induction and mutation in media containing different concentrations of -2,4 was performed. The third experiments involved the evaluating of resistance and remeditaion rate of callus to Cadmium at the concentrations of 0-40 mg L^{-1} in both treated and untreated with EMS. The highest rate of survival and induction of callus was induced by the concentration of 1 mg L-1 2,4-D in the shortest time. EMS at concentration of 0.2% and 30 minute, made the maximum survival and minimum blacking phenomenon of explants. The highest accumulation of Cadmium 1053.56 mg kg/L DW was obtained from callus treated by 40 mg/L Cadmium.

Keywords: EMS, Mutation, Heaevy metals, Phytoremediation, Tissue culture.

1- MSC Student Arak University Horticultural, Iran

2- Assistance professor, Department of Horticulture, University of Arak, Iran

*(Corresponding Author: m-taghizadeh@araku.ac.ir)

3- Associate professor, Department of Horticulture, University of Arak, Iran