فصلنامه (علمی – پژوهشی)

زیست شناسی تکوینی

سال نهم، شماره ۱، زمستان ۱۳۹۵

بررسی اثرات نیترات کادمیوم وتنظیم کننده های رشد در کشت بافت گیاه لوبیا چیتی *Phaseolus vulgaris* L.

آیدا تقی زاده قویدل [*]، احمد مجد، معصومه میرزایی

گروه زیست شناسی دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، تهران، ایران

[*] E.mail: aida.tgh@gmail.com

تاریخ دریافت : ۹۵/۰۹/۳۰ تاریخ پذیرش: ۹۵/۱۲/۱۹

چکیده

کادمیوم فلز سنگینی که مقادیر سمی آن به طور طبیعی در خاک وجود دارد و یا بوسیله فعالیت‌های صنعتی،معدن کاوی وکودهای کشاورزی واردخاک می‌شود. گیاه لوبیا یکی ازگیاهانی که توان تحمل سمیّت کادمیوم رادارد. گیاه لوبیا از مهمترین اعضای تیره باقلائیان(Fabaceae) که اهمیت اقتصادی بالایی در تغذیه انسان دارد.یکی از روش‌های مناسب برای حفظ وازدیاد گیاهان،باززایی از طریق کشت بافت محسوب می‌شود. در پژوهش حاضر، بررسی اثرات نیترات کادمیوم و تنظیم کننده‌های رشد در کشت بافت گیاه لوبیا چیتی، درصد جوانه زنی، ریشه‌زایی وکالوس‌زایی بذرهای گیاه لوبیا چیتی رقم (Cos16) در محیط‌های دارای نیترات کادمیوم و هورمون 2ip(۲- ایزوپنتنیل آدنین) با محیط MS در قالب طرح کاملا تصادفی درآزمایشگاه مورد سنجش قرارگرفتند. در ابتدا بذرها به ترتیب: با اتانول ۷۰درصد، آب مقطرو هیپوکلریت سدیم ۵ درصد به صورت سطحی سترون شدند. بذرهای سترون به منظور بررسی درصد جوانه‌زنی در محیط‌های کشت متفاوت شامل محیط T0(MS); T1(MS+2ip:0.1mg/l); T2(MS+ CdNO3:0.05mg/l+2ip:0.1mg/l); T3(MS+CdNO3:0.05mg/l) کشت شدند.از دانه رست های ۱۰روزه ی سترون به دست آمده از کشت بذرها در محیط T0، جداکشت‌های برگ و محور زیر لپه تهیه شدند و در محیط‌های T0(MS), T1(MS+2ip:3mg/l), T2(MS+2ip:5mg/l) قرار گرفتند. تعدادی از جداکشت‌های محور زیر لپه به محیط‌های T1(MS+NAA:0.5mg/l), T2(MS+BAP:2.5mg/l) انتقال یافتند. در نهایت کالوس‌های جداکشت محور زیر لپه از محیط T0 در محیط‌های T0(MS), T1(MS+CdNo3:0.05mg/l), T2(MS+CdNo3:0.1mg/l) کشت شدند. طبق نتایج، بیشترین و کمترین درصد جوانه‌زنی به ترتیب در محیط T0(MS) و T3(MS+CdNo3:0.05mg/l)، بهترین درصد کالوس‌دهی در محیط T0(MS) در جداکشت محور زیر لپه مشاهده شد. بیشترین ریشه‌زایی در جداکشت برگ در محیط T2(MS+2ip:5mg/l) و بهترین کالوس‌زایی و ریشه‌زایی در جداکشت محور زیر لپه در محیط T3(MS+NAA:0.5mg/l +BAP:2.5mg/l) صورت گرفت. سرانجام در کشت کالوس‌های محور زیر لپه، بهترین کالوس و بیشترین ریشه‌زایی در محیط فاقد نیترات کادمیوم: T0(MS) حاصل شد.این پژوهش نشان داد که افزایش مقدار کادمیوم بر درصد جوانه زنی و کالوس زایی اثر بازدارنده دارد..

کلیدواژه‌ها: کادمیوم ، لوبیا ،۲- ایزوپنتنیل آدنین، α- نفتالین استیک اسید، ۶- بنزیل آمینوپورین

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه

حبوبات بعد از گندم، برنج و ذرت، مهمترین محصولات کشاورزی هستند که در کنار پروتئین حیوانی و با داشتن بیش از ۲۵ درصد پروتئین، می‌توانند غذای کاملی برای انسان باشند، عملکرد دانه در گیاهان زراعی یکی از مهمترین صفات مورد ارزیابی و بسیار مورد توجه اصلاح‌گران گیاهان است [۸]. کمبود پروتئین یا عدم توازن بین مصرف پروتئین و هیدرات کربن از مشخصات رژیم غذایی کشورهای در حال توسعه از جمله ایران است. بنابراین یکی از نیازهای اساسی کشور در زمینه تولید محصولات کشاورزی تامین پروتئین گیاهی است ،مطالعات حاکی از آن است که ترکیب مناسبی از پروتئین گیاهی می‌تواند سوءتغذیه و کمبود پروتئین را برطرف سازد. قسمتی از کمبود پروتئین را می‌توان به وسیله مصرف حبوبات جبران نمود. لوبیا یکی از مهمترین حبوبات است که در ایران سطح کشتی بالغ بر ۱۲٤۰۰۰ هکتار دارد، ارزش بالای این محصول شامل ۲۵٪ پروتئین و ٦۰٪ کربوهیدرات است که سبب شده سهم عمده‌ای را در جیره غذایی انسان به خود اختصاص دهد[۳]. آلودگی خاک به فلزات سنگین به ویژه با ورود پساب‌های آلوده و استفاده بی‌رویه از کودهای فسفاته دارای کادمیوم یک مشکل فزاینده می‌باشد .دوام بلندمدت زیستی و باقی ماندن در خاک سبب انباشته شدن این فلزات در زنجیره غذایی ودر نتیجه تاثیرات منفی بالقوه برای سلامتی انسان می‌گردد. میزان دسترسی به این فلزات به نوع گیاه، میزان مورد نیاز آنها به عنوان ریزمغذی، قابلیت گیاهان برای تنظیم کارآمد متابولیسم آنها از طریق ترشح اسیدهای آلی یا پروتون‌ها به محیط ریشه بستگی دارد. آزمایش‌های مسمومیت گیاهی ناشی از سمیت فلزات برای برخی از گونه‌های خشکی زی گیاهان گزارش شده است[۷].

کادمیوم اگرچه یک عنصر غذایی ضروری نیست اما به سهولت از طریق ریشه‌های گیاه جذب وبا غلظتی که برای زنجیره غذایی خطرناک است،در گیاه ذخیره می شود. تجمع کادمیوم در بافت‌های گیاهی در سطح سلولی نیز می‌تواند سمی باشد وموجب کاهش رشد گردد. بنابراین جلوگیری از جذب کادمیوم توسط ریشه‌های گیاه می‌تواند یک راهکار مهم در به حداقل رساندن اثرات زیان بارزیستی این عنصر باشد[۱۷]. جذب و تحرک کادمیوم در گیاه به گونه گیاه ،غلظت عناصر غذایی، شرایط رشدی گیاه و ترکیب سایر عناصر فلزی بستگی دارد [۱۳]. کبالت، کادمیوم و نیکل فلزاتی هستند که بالاترین درصد ذخیره آنها در بخش پلی ساکاریدهای دیواره سلولی برگ‌ها، ساقه‌ها و ریشه‌ها می‌باشد. حلالیت و در دسترس بودن فلزات برای گیاهان ممکن است توسط چندین عامل از قبیل سرعت برداشت آنها، ویژگی‌های شیمیایی، pH، بافت خاک، مواد آلی موجود در آن، ظرفیت تبادل کاتیونی و غیره که تعیین کننده جذب از راه‌های مختلف توسط گونه‌های مختلف و در مکان های مختلف است، تحت تاثیر قرار گیرد. کادمیوم اغلب در ریشه‌های گیاهان تجمع می‌یابد و مقدار اندکی به برگ‌ها منتقل می‌شود [۱۹-۱۵]. جذب کادمیوم توسط گیاه به سیستمی وابسته است که نه تنها از نظر متابولیکی بیشتر حالت واسطه دارد بلکه با سیستم‌های جذب سایر عناصر نیز رقابت می‌کند [۱۳].

از آنجایی که گیاه لوبیا (*Phaseolus vulgaris* L.) گیاهی بیش اندوز در رابطه با کادمیوم وسرب می‌باشد [۱۲] دراین پژوهش مورد توجه قرار گرفته است. نظر

Archive of SID

www.SID.ir

به اهمیت لوبیا به عنوان مهم ترین گیاه زراعی در تیره باقلائیان وحساسیت آن به خشکی و شوری خاک، با بهینه‌سازی کشت بافت این گیاه می‌توان زمینه را برای افزایش مقاومت گیاه به تنش‌های محیطی فراهم آورد. تاکنون با استفاده از هورمون‌های مختلف باززایی گیاه لوبیا به دفعات انجام گرفته و هدف بیشتر آنها مطالعه کالوس‌ها و سنجش عناصر مختلف در آن بوده است [۶]. تحقیق حاضر، به بررسی اثر تنظیم‌کننده‌های رشد و تاثیر آلودگی نیترات کادمیوم (آلاینده مضر زیستی) بر گیاه لوبیا در محیط کشت MS [۲۱] می‌پردازد.

مواد و روش‌ها

گیاه مورد بررسی در این پژوهش، لوبیا چیتی رقم Cos16 بود. بذرهای مورد نظر از سازمان معاونت زراعت جهاد کشاورزی تهران در سال ۱۳۹٤ تهیه شدند. بذرهای لوبیا پس از شستشو، ابتدا برای سترون‌سازی سطحی به مدت ۳ دقیقه در اتانول ۷۰ درصد و سپس ۲ دقیقه در آب مقطر و در نهایت ۹۰ ثانیه در هیپوکلریت سدیم ۵ درصد قرار گرفتند. پس از آن ۳ بار با آب مقطر سترون شستشو داده شدند. از کاغذصافی سترون برای خشک کردن بذرها استفاده شد.

بررسی درصد جوانه زنی

بذرهای سترون در چهارنوع محیط کشت (2ip: 0.1 mg/l + MS) T1, (Control: MS) T0، (2ip: 0.1mg/l+Cd No3: 0.05mg/l + MS) T2 و (Cd No3: 0.05 mg/l+MS) T3 کشت شدند. سپس پلیت‌های کشت در شرایط نوری ۱٦ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی، در دمای ۲۸ تا ۳۰ درجه سانتی‌گراد قرارزگرفتند. پس از یک هفته درصدجوانه‌زنی در گروه‌های مختلف تحت تیمار سنجش ومقایسه شد.

بررسی مراحل باززایی

پس از هجده روز که دانه رست‌ها به حدّ مناسبی رشد کردند جداکشت‌های مختلف شامل: قطعات برگ و محور زیر لپه ازآنها تهیه شد. بررسی مراحل باززایی در گیاه، قطعات جداکشت برگ و محور زیر لپه به طور جداگانه، با هشت تکرار و سه عدد جداکشت در هر پلیت، با تیمارهای متفاوت (Control:MS) T0 (2ip: 5mg/l + MS) T2;(2ip: 3 mg/l + MS) T1, قرار داده شدند. نمونه‌ها به اتاق کشت منتقل شده و کالوس‌زایی وریشه زایی جداکشت‌ها پس از یک تا دو ماه بررسی‌شدند. تعدادی ازجداکشت‌های محور زیرلپه با هشت تکرار و سه عدد جداکشت در هر شیشه، با تیمارهای متفاوت (NAA: 0.5 mg/l + MS) T1, (BAP:2.5 mg/l +MS) T2 و (BAP:2.5mg/l + NAA: 0.5 mg/l + MS) T3 منتقل شدند. نتایج کالوس‌زایی وریشه‌زایی جداکشت‌ها از یک هفته تا یک ماه پس از کشت ثبت شدند.

بررسی اثر نیترات کادمیوم بر باززایی

جداکشت‌های محور زیر لپه دارای کالوس از محیط‌های شاهد T0، پس از یک ماه در محیط‌های متفاوت نیترات کادمیوم شامل: (Control: MS) T0, (Cd No3: 0.05 mg/l+MS) T1 و (Cd No3: 0.1 mg/l+MS) T2 با شش تکرار وسه جداکشت درهر پلیت، واکشت شده و به اتاق کشت انتقال داده شدند.

تحلیل داده‌ها

همه آزمایش‌ها به صورت فاکتوریل در قالب طرح

Archive of SID

www.SID.ir

کاملا تصادفی انجام شد که در آنها آثار اصلی شامل تیمارهای هورمونی و انواع قطعات جداکشت بود. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم افزار (SPSS16) و آزمون دانکن (محاسبه میانگین) در سطح احتمال ۵ درصد مورد ارزشیابی قرار گرفت و رسم نمودارها توسط نرم افزار Excel انجام شد.

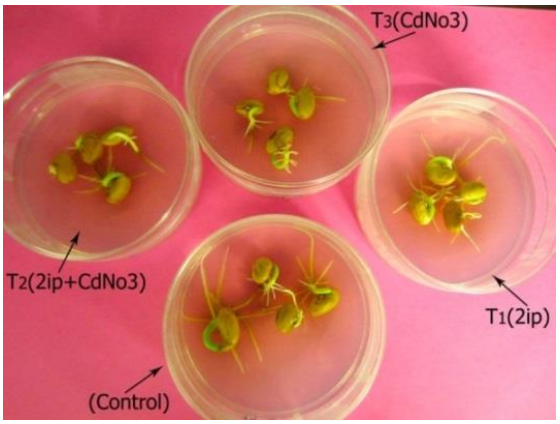
نتایج

بررسی تاثیر نیترات کادمیوم و هورمون 2ip بر درصد جوانه زنی بذرها

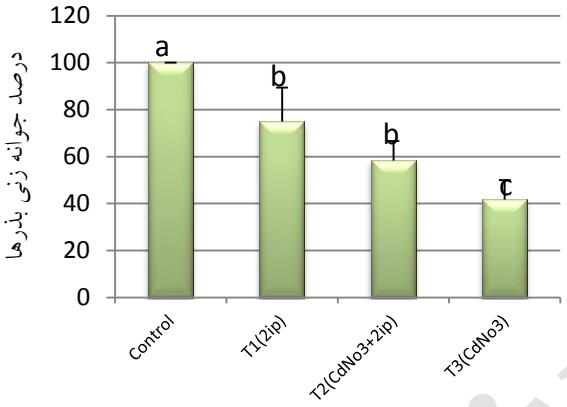
دراین مطالعه، بررسی جوانه زنی دانه رست‌های لوبیا با آغاز جوانه زنی اولین بذرها در روز سوم تا آخرین جوانه زنی در روزهفتم پس از اعمال تیمارها ادامه یافت (شکل ۱). نتایج حاکی از آن است که تفاوت درصد جوانه‌زنی بذرها بین نمونه شاهد (Control :T0) و تیمار (T3) نیترات کادمیوم در سطح ۵ ٪ معنی‌دار شد. بیشترین درصد جوانه‌زنی مربوط به نمونه شاهد (T0) ۱۰۰٪ و کمترین درصد جوانه‌زنی مربوط به تیمار (T3) نیترات کادمیوم٤١/٦٦٪ است (شکل۲).

بررسی تاثیر هورمون 2ip برجداکشت های برگی

بررسی‌ها در روز بیست وهشتم پس از کشت جداکشت‌ها نشان داد که تفاوت درصدکالوس زایی جداکشت‌های برگی در تیمار (T2) و نمونه شاهد (Control :T0) در سطح ۵ ٪ معنی‌دار است. بطورکلی، کمترین درصد کالوس‌زایی مربوط به نمونه شاهد (T0) ۳۳/۳٪ و بیشترین درصد کالوس‌زایی مربوط به نمونه تیمار(T2) ۷۷/۷۳٪ می‌باشد. (شکل ۳)



شکل۱- مقایسه آغاز جوانه زنی بذرها در نمونه های شاهد (Control :T0) وتحت تیمار(T:Treatment) (روز هفتم)



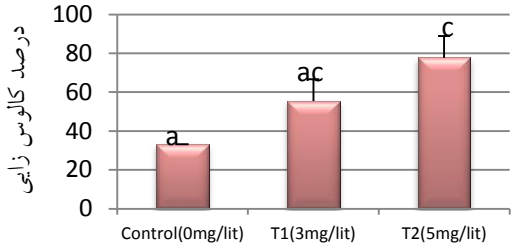
شکل ۲- درصد جوانه زنی بذرهای لوبیا در نمونه‌های شاهد (Control :T0) و تحت تیمار (T:Treatment) (روزهفتم)

جدول ۱ : تجزیه واریانس (ANOVA) درصد جوانه زنی(GR) تحت تیمارهای متفاوت نیترات کادمیوم وهورمون 2ip (روزهفتم).

GR(%)	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	5572.917	3	1857.639	7.133	0.012
Within Groups	2083.333	8	260.417		
Total	7656.25	11			

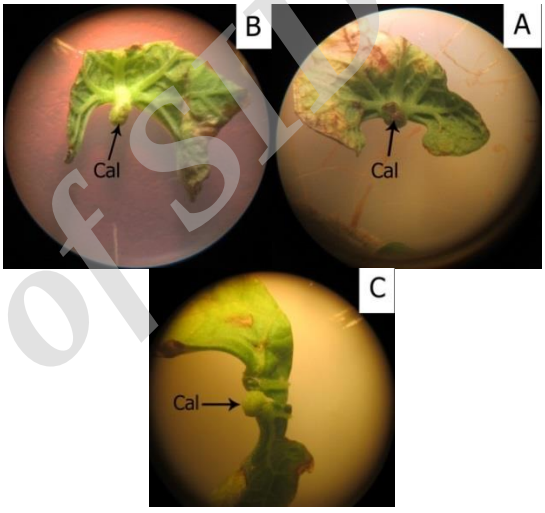
Archive of SID

www.SID.ir



تیمار: هورمون 2ip

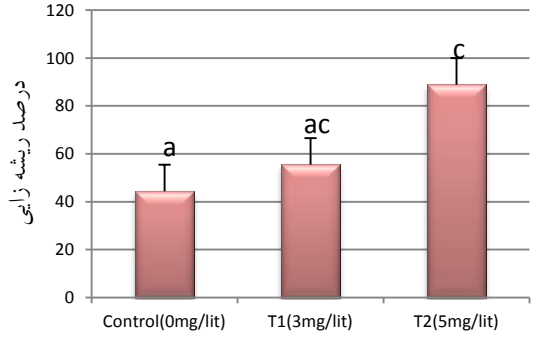
شکل۳- مقایسه درصدکالوس زایی جداکشت های برگی در نمونه‌های شاهد (T0: Control) وتحت تیمار(T:Treatment) تحت تاثیر هورمون 2ip(روز بیست وهشتم)



شکل٤- مقایسه کالوس زایی جداکشت‌های برگی در نمونه های شاهد(T0: Control) وتحت تیمار(T:Treatment) (روز بیست و هشتم)، (Cal:کالوس)،A : (Control) T0
.(2ip: 5mg/l) T2:C،(2ip: 3mg/l)T1: B

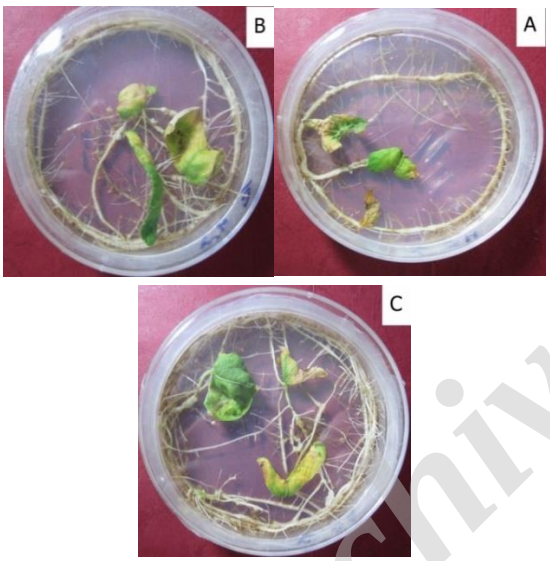
در (شکل ٤): تیمار (T2) رنگ کالوس سبز، در تیمار (T1) رنگ کالوس سبز تیره ونمونه شاهد (T0) رنگ کالوس قهوه‌ای می‌باشد.

بررسی‌ها در روز چهل و دوم پس از کشت جداکشت‌ها نشان داد که، کمترین درصد ریشه زایی مربوط به نمونه شاهد (Control)٤٤/٤٪ و بیشترین درصد ریشه‌زایی در تیمار (T2) ٨٨/٨٦٪ می‌باشد و اختلاف درصد ریشه‌زایی جداکشت‌های برگی در تیمار (T2) و نمونه شاهد (T0) در سطح ٥٪ معنی‌دار است. (شکل ٥)



تیمار:هورمون 2ip

شکل٥ – درصد ریشه زایی جداکشت های برگی درنمونه های شاهد (T0: Control) وتحت تیمار (T:Treatment)، تحت تاثیر هورمون2ip (روز چهل ودوم)



شکل٦- مقایسه ریشه زایی جداکشت‌های برگی درنمونه های شاهد (T0: Control) وتحت تیمار (T:Treatment)
(روزچهل و دوم)، A : (Control) T0
.(2ip: 5mg/l) T2:C،(2ip: 3mg/l)T1: B

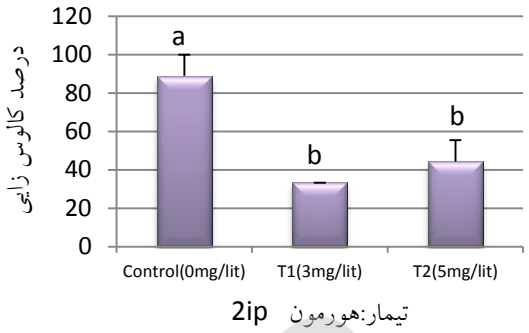
بررسی تاثیر هورمون 2ip بر جداکشت‌های محور زیر لپه

هشت روز پس از کشت جداکشت‌ها شروع کالوس زایی مشاهده شد و نتایج نشان داد که کمترین درصد کالوس‌زایی مربوط به تیمار (T1)٣٣/٣٪ وبیشترین درصد کالوس‌زایی را نمونه شاهد (T0) ٨٨/٨٦٪ داشته است. تفاوت درصد کالوس‌زایی

Archive of SID

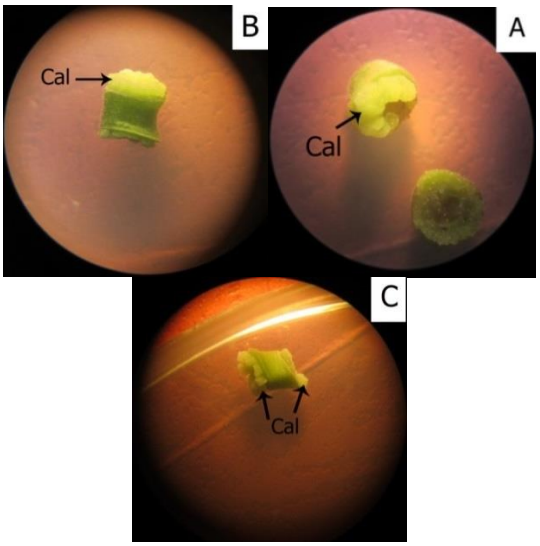
www.SID.ir

جداکشت‌های محور زیر لپه در نمونه شاهد در مقایسه با سایر تیمارها در سطح ۵٪ معنی‌دار است. (شکل ۷)



شکل۷- مقایسه اثر هورمون 2ip بر درصد کالوس زایی جداکشت های محور زیر لپه درنمونه های شاهد(T0: Control)وتحت تیمار(T:Treatment) (روزهشتم)

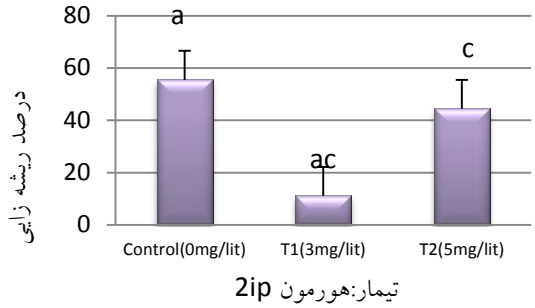
در (شکل۸) در نمونه شاهد (T0) رنگ کالوس سبز متمایل به سفید، در تیمار (T2) رنگ کالوس سبز و تیمار (T1) رنگ کالوس سبز می‌باشد.



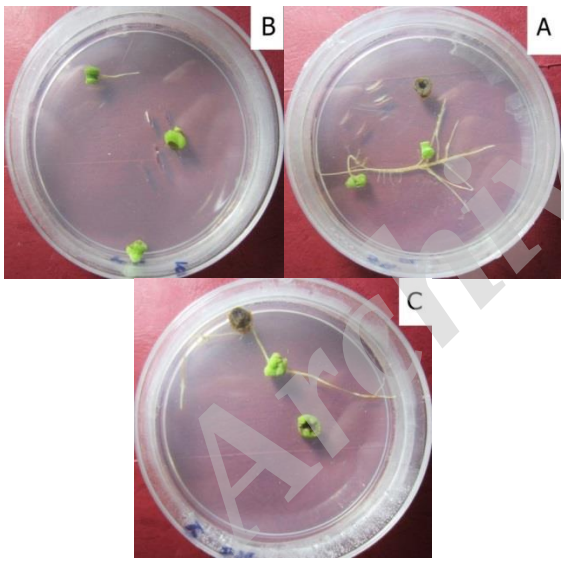
شکل ۸- مقایسه کالوس زایی جداکشت های محورزیرلپه در نمونه‌های شاهد(T0: Control) وتحت تیمار (T:Treatment) (روز هشتم)، A : T0 (Control)

.(2ip: 5mg/l) T2:C،(2ip: 3mg/l)T1:B

بررسی‌ها در روز بیست وهشتم پس از کشت، مشخص کردند که کمترین درصد ریشه‌زایی مربوط به تیمار(T1) ۱۱/۱٪ و بالاترین درصد ریشه‌زایی در نمونه شاهد (T0)۵۵/۵٪ می‌باشد. تفاوت در صد ریشه‌زایی جداکشت های هیپوکوتیل درنمونه شاهد وتیمار (T2) در سطح ۵٪معنی دار است. (شکل ۹)



شکل ۹- مقایسه اثر هورمون 2ip بر درصد ریشه زایی جداکشت‌های محور زیر لپه درنمونه‌های شاهد (T0: Control)و تحت تیمار (T:Treatment) (روز بیست وهشتم)



شکل۱۰- مقایسه ریشه زایی جداکشت های محور زیرلپه در نمونه‌های شاهد (T0: Control) و تحت تیمار (T:Treatment) (روز بیست و هشتم)،A : T0 (Control)

.(2ip: 5mg/l) T2:C،(2ip: 3mg/l)T1:B

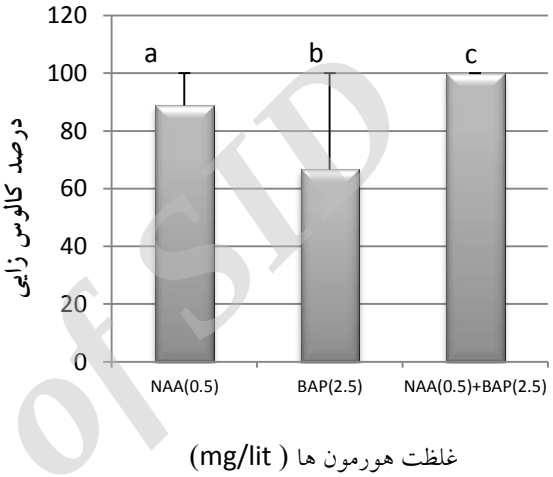
بررسی تاثیر هورمون‌های NAA و BAP بر جداکشت‌های محورزیرلپه

یک هفته پس از کشت جداکشت‌ها، کمترین

Archive of SID

www.SID.ir

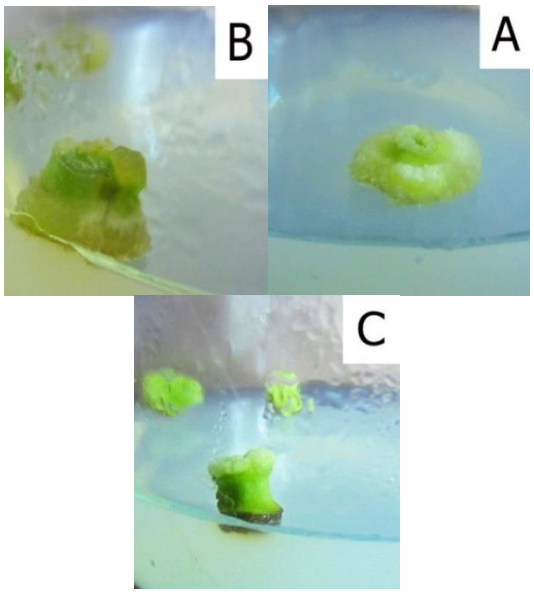
درصد کالوس‌زایی در تیمار (T2: BAP 2.5 mg/l) ٦٦/٦ ٪ و بیشترین درصد کالوس زایی درتیمار (T3: BAP2.5 mg/l + NAA0.5 mg/l) ۱۰۰٪ دیده شد. اختلاف درصد کالوس زایی جداکشت‌های محور زیرلپه در تمامی تیمارها در سطح ۵٪ معنی‌دار است. (شکل ۱۱)



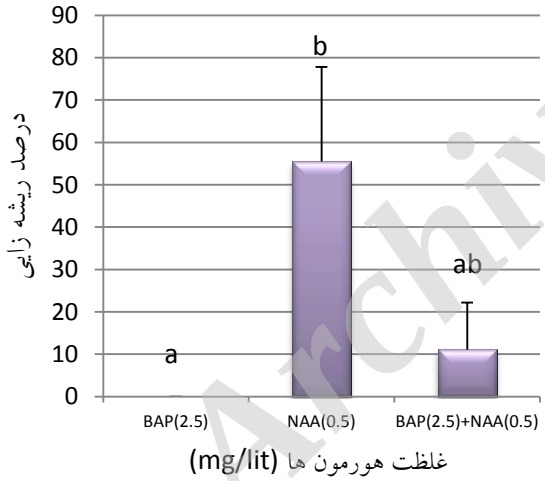
شکل۱۱- مقایسه اثر هورمون های NAA، BAP، NAA+BAP بر درصد کالوس زایی جداکشت های هفت روزه محور زیرلپه

رنگ کالوس‌ها در روز هفتم (شکل ۱۲) نشان می‌دهد، در تیمار(T3: BAP+ NAA) رنگ کالوس سبز روشن متمایل به سفید، در تیمار (T1: NAA) کالوس به رنگ سبز وتیمار (T2: BAP) رنگ کالوس سبز دیده شد.

بیشترین درصد ریشه زایی جداکشت‌ها هفت روز پس از کشت، مربوط به تیمار (T1: NAA 0.5mg/l) ۱۱/۱٪ و کمترین درصد مربوط به تیمار (T2: BAP2.5 mg/l) صفر درصد می‌باشد. اختلاف درصد ریشه‌زایی جداکشت‌ها تحت تیمارهای (T2:BAP) و (T1: NAA) در سطح ۵٪ معنی‌دار است. (شکل ۱۳)



شکل۱۲- مقایسه کالوس زایی جداکشت های هفت روزه محورزیرلپه تحت تاثیر هورمون های متفاوت
A : (NAA 0.5mg/l+BAP 2.5mg/l)،
B: (NAA 0.5mg/l)، C : (BAP 2.5mg/l).



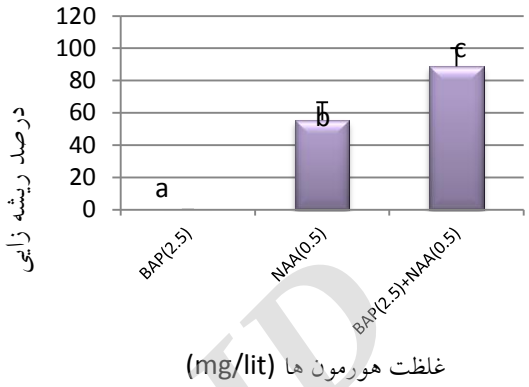
شکل۱۳- مقایسه اثر هورمون های NAA، BAP، NAA+BAP بر درصد ریشه زایی جداکشت‌های هفت روزه محور زیرلپه

بررسی‌های یک ماه پس از کشت، بیشترین درصد ریشه‌زایی را در تیمار (T3: BAP +NAA 0.5 mg/l 2.5 mg/l) ۸۸/۸٦٪ وکمترین درصد ریشه زایی را در تیمار (T2: BAP 2.5 mg/l) صفردرصد نشان داد. تفاوت درصد ریشه زایی جداکشت‌ها در تمامی

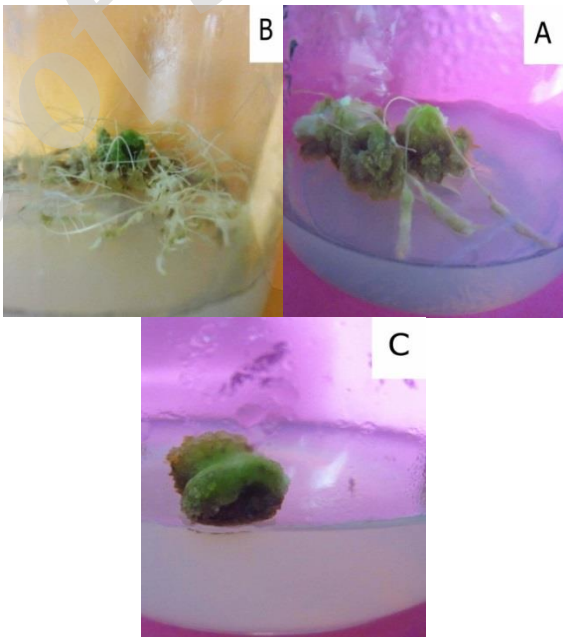
Archive of SID

www.SID.ir

تیمارها در سطح ۵٪ معنی دار می‌باشد (شکل ١٤). در شکل ۱۵ می‌توان مقایسه ریشه زایی جداکشت‌های محورزیرلپه را تحت تیمارهای متفاوت مشاهده کرد.



شکل١٤- مقایسه اثر هورمون های NAA، BAP، NAA+BAP بر درصد ریشه زایی جداکشت های سی روزه محور زیرلپه

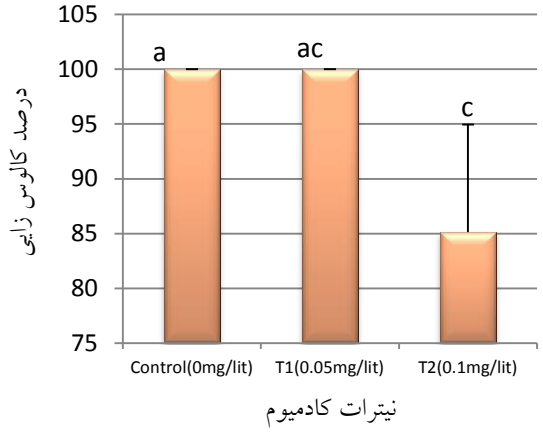


شکل۱۵- مقایسه ریشه زایی جداکشت های سی روزه محورزیرلپه تحت تاثیر هورمون های متفاوت

A : (NAA 0.5mg/l + BAP 2.5mg/l)، B: (NAA 0.5mg/l)، C : (BAP 2.5mg/l).

بررسی تاثیر نیترات کادمیوم برکالوس‌های محور زیر لپه

سی و پنج روز پس از واکشت جداکشت‌های محور زیر لپه بیشترین درصد کالوس‌زایی جداکشت‌ها در نمونه شاهد (T0: Control) و تیمار (T1) ۱۰۰٪ و کمترین درصد کالوس‌زایی را در تیمار (T2) ۸۵/۱۳٪ نشان داد. تفاوت درصد کالوس زایی جداکشت های محورزیرلپه حاصل از واکشت در نمونه شاهد (T0) و تیمار (T2) در سطح ۵٪ معنی دار است. (شکل ١٦)



شکل١٦- مقایسه درصد کالوس زایی جداکشت های سی وپنج روزه محور زیرلپه در غلظت های مختلف نیترات کادمیوم (Control) T0،

(CdNo3: 0.05mg/l)T1،

(CdNo3: 0.1mg/l)T2.

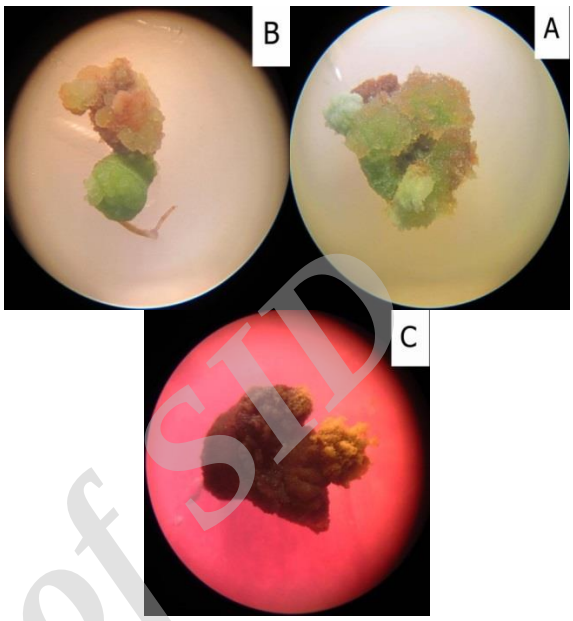
شکل (۱۷) نشان دهنده آن است که: رنگ کالوس در نمونه شاهد (T0) سبز- مایل به قهوه‌ای داشته است، در تیمار(T1) رنگ کالوس سبزمایل به قهوه‌ای روشن داشت و تیمار (T2) کالوس قهوه ای بود.

چهل و پنج روز پس ازواکشت جداکشت‌ها، نتایج نشان دادکه کمترین درصد ریشه‌زایی مربوط به تیمار (T2) ۲۲/۲ ٪ و بالاترین درصد ریشه‌زایی در نمونه شاهد (Control) ٤٤/٤٪ است. اختلاف درصد ریشه‌زایی جداکشت‌ها در نمونه شاهد و تیمار (T2) در سطح ۵٪معنی دار است (شکل ۱۸).

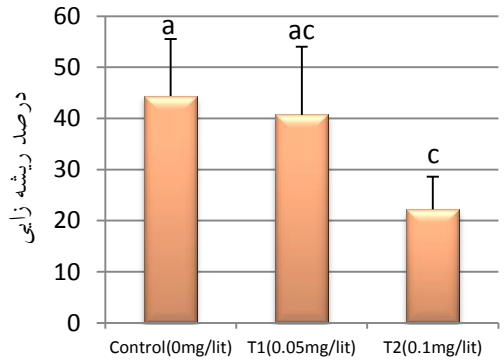
Archive of SID

www.SID.ir

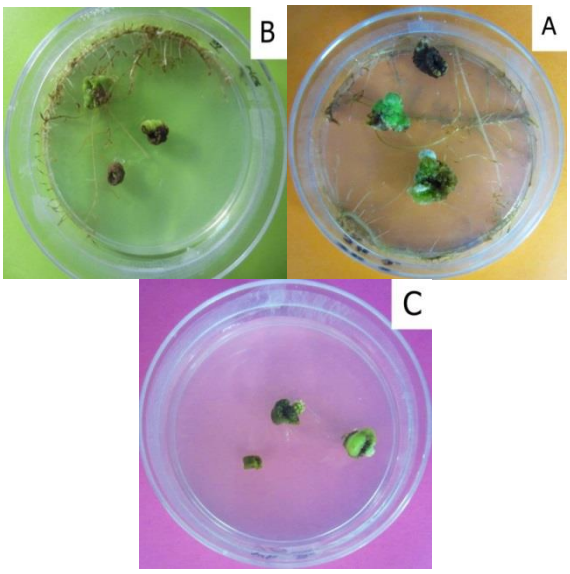
در شکل (۱۹) ریشه زایی واکشت جداکشت‌های محور زیر لپه درغلظت‌های مختلف نیترات کادمیوم مقایسه شده است.



شکل۱۷- مقایسه کالوس زایی جداکشت های سی و پنج روزه محور زیر لپه حاصل از واکشت آنها در غلظت‌های مختلف نیترات کادمیوم A:T0 (Control) ، B : T1 (CdNo3:0.05mg/l)، C: T2 (CdNo3: 0.1mg/l).

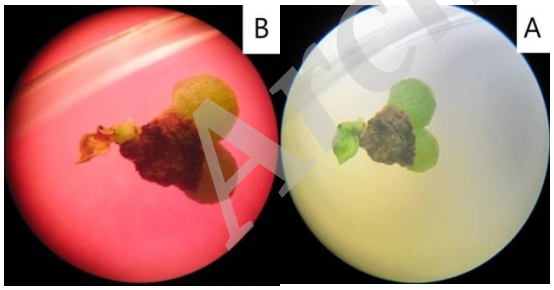


شکل۱۸- مقایسه درصد ریشه زایی جداکشت‌های چهل وپنج روزه محور زیرلپه در غلظت های مختلف نیترات کادمیوم T0 (Control)، T1(CdNo3: 0.05mg/l)، T2(CdNo3: 0.1mg/l).



شکل۱۹- مقایسه ریشه‌زایی جداکشت های چهل وپنج روزه محورزیر لپه درغلظت‌های مختلف نیترات کادمیوم، A:T0 (Control) : B ، T1 (CdNo3: 0.05mg/l)، C: T2 (CdNo3:0.1mg/l).

در (شکل ۲۰) تیمار (T2) از جداکشت محور زیر لپه، برگی سبز در ابتدا ظاهرشد، اما باگذشت زمان برگ رو به زردی رفت که این مسئله نشان دهنده اثر منفی نیترات کادمیوم با غلظت بالا بر جداکشت‌های محور زیرلپه می باشد.



شکل۲۰- مقایسه زرد شدن برگ حاصل از جداکشت محورزیرلپه در غلظت ۰/۱میلی گرم درلیتر نیترات کادمیوم در مدت زمان (۳۵ روز) ، A) برگ سبز (روز پانزدهم) B) برگ تقریبا زرد شده (روز پنجاهم)

بحث و نتیجه‌گیری

نتایج درصد جوانه زنی نشان داد که تیمار نیترات

Archive of SID

www.SID.ir

کادمیوم T3 (CdNo3: 0.05 mg/l) نسبت به دیگر نمونه ها باعث کاهش جوانه زنی در بذرها شد که این امر می‌تواند نشان دهنده تجزیه مواد غذایی ذخیره شده دانه دراثر کاربرد کادمیوم وهمچنین نتیجه کاهش جذب آب وتخریب ساختار پروتئین‌هایی باشد که در جذب آب شرکت دارند [۲۵].

در نتایج حاصل از بررسی تاثیر هورمون 2ip بر جداکشت برگ و محور زیرلپه بیشترین کالوس زایی وریشه زایی جداکشت برگ در غلظت ۵ میلی‌گرم در لیتر هورمون 2ip وبیشترین کالوس‌زایی وریشه‌زایی در جداکشت محور زیرلپه در غلظت صفر میلی‌گرم در لیتر هورمون 2ip مشاهده شد. در مقایسه جداکشت برگ و محور زیر لپه بیشترین کالوس‌زایی در جداکشت محور زیرلپه و رنگ کالوس محور زیرلپه سبز روشن و پایدارتر و گسترده تر، رنگ کالوس برگ، سبز و پایدار و محدود، و بیشترین ریشه‌زایی در جداکشت برگ به اثبات رسید. این تفاوت‌ها اهمیت نوع جداکشت در توانایی کالزایی و ریشه‌زایی را نشان می‌دهد. در کل هنگامی که جداکشت‌های متفاوت بر روی یک محیط‌کشت ودر شرایط محیطی مساوی نور، دما و رطوبت نتایج کال‌زایی متفاوتی را نشان می دهند و تمامی جداکشت‌های مشابه در این شرایط نتایج تقریبا یکسانی را آشکار می‌سازند. می‌توانیم نتیجه‌گیری کنیم که تفاوت نتایج حاصل مربوط به تفاوت نوع جداکشت‌های می‌باشد. این تفاوت می‌تواند مربوط به میزان ذخایر وبه ویژه هورمون های درون زا (آندوژن)،سن تاحدی متفاوت جداکشت ها ومیزان قطبیت حاکم بر آن ها باشد[۹]. پژوهشگران در بررسی‌های خود جداکشت‌های متفاوتی را برای مراحلی از کشت بافت گیاه لوبیا مناسب گزارش کرده‌اند که از جمله می‌توان: Saxena, Malik (۱۹۹۱) [۱۸] برگ؛ امیری و فهیمی (۱۳۸۲) [۱] محور زیرلپه؛ Ahmed و همکاران (۲۰۰۲) [۱۱] گرهک لپه‌ای؛ El-Shemy و همکاران (۲۰۰۲) [۱۴] محور بالای لپه ؛Veltecheva و همکاران (۲۰۰۵) [۲۷] برگ و کرمی و باقریه نجار (۱۳۹۱) [۶] محور زیرلپه را نام برد. این گزارش‌ها نیز اهمیت نوع جداکشت ومحیط‌های متفاوت برای موفقیت در کشت بافت گیاه لوبیا را مشخص می‌سازند.

نتایج بررسی‌های تاثیر هورمون‌های NAA وBAP برجداکشت‌های محور زیرلپه حاکی از آن است که بیشترین درصد کالوس‌زایی در تیمار (BAP+NAA) و تیمار (NAA) وکمترین درصد کالوس‌زایی در تیمار (BAP) می‌باشد ودر رابطه به ریشه‌زایی، بیشترین درصد ریشه‌زایی در تیمار (BAP+NAA) دیده شد و ریشه زایی در تیمار(BAP) محسوس نبود .طبق تحقیقات یاری شورابه و کریمی در سال ۱۳۹۰، بالاترین درصد کالوس‌زایی مربوط به ریز نمونه محور زیرلپه می باشد و بهترین کالوس‌ها در تیمار هورمونی متشکل از دو هورمون سیتوکینینی واکسینی ایجاد می‌شوند[۱۰]. تحقیقات کرمی وهمکاران در سال ۱۳۹۱ بر گیاه لوبیا حاکی از آن است که بیشترین تولید کالوس در قطعات جداکشت محور زیرلپه در غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر هورمون BAP و ۰/٤ میلی‌گرم در لیتر هورمون NAA است. در غلظت ۰/٤ میلی‌گرم در لیتر هورمون NAA به تنهایی کالوس‌زایی کمتر می‌شود و نتایج نشان می‌دهد که هر دو هورمون BAP+NAA باعث القای فرایند کالوس‌زایی در قطعات جداکشت محور زیرلپه می‌شود[۶]. در رابطه با ریشه‌زایی هورمون NAA نقش بسزایی دارد. می‌توان گفت که غلظت تنظیم کننده‌های رشد مورد استفاده ،بستگی به نوع محیط کشت، نوع سیتوکینین واکسین به کاربرد

Archive of SID

www.SID.ir

شده دارد[۲۴]. بسیاری از گونه‌های باقلائیان مانند لوبیا تمایل بیشتری به تشکیل ریشه نسبت به ساقه دارند[۲۸]. نتایج حاصل از پژوهش حاضر نیز این مهم را به اثبات می‌رساند. در نتایجی غیر مشابه امیری و فهیمی در سال ۱۳۸۲، بهترین کالوس‌ها را در قطعات جداکشت محور زیرلپه گیاه لوبیا رقم ناز در غلظت ۵ میلی‌گرم در لیتر هورمون 2,4-D و ۲/۵میلی‌گرم در لیتر هورمون Kin به دست آوردند. قابل تامل است که هورمون‌های BAPوNAA نسبت به هورمون‌های 2,4-D و Kin، هورمون‌های ضعیف تری محسوب می‌شوند[۱].

مطالعات تاثیر نیترات کادمیوم بر واکشت جداکشت‌های محور زیرلپه نشان دادند که بهترین کالوس‌زایی و ریشه‌زایی در نمونه شاهد و تیمار نیترات کادمیوم (۰/۰۵میلی‌گرم در لیتر) و کمترین کالوس‌زایی و ریشه‌زایی در تیمار نیترات کادمیوم (۰/۱ میلی‌گرم در لیتر) دیده شد که این نشان دهنده اثر بازدارنده نیترات کادمیوم می‌باشد. این نتایج با گزارش‌های (Zagoskina and et al., 2007) برگیاه tea plant (*Camellia sinensis L.*) همسو می‌باشد که تاثیر نیترات کادمیوم بر کالوس‌های تهیه شده از برگ وساقه ،نشان دهنده آن است که کادمیوم وسعت توده کالوسی را کاهش می‌دهد ودر کالوس‌های حاصل از ریشه تغییری مشاهده نمی‌شود ودرنهایت در غلظت‌های خیلی بالای کادمیوم محیط‌کشت و کالوس از بین می‌روند[۲۹]. تاثیر کادمیوم ناسازگاری‌هایی را در رشد کالوس ایجاد می کند که این رفتار به غلظت آن بستگی دارد وکاهش رشد کالوس در غلظت‌های بالای کادمیوم به محتوای بالای کادمیوم در کالوس مرتبط است و این مشاهدات با مطالعات بر *Sesbania drummondii* [۱۶,۲۳] و *Cuscuta* [۲۶] *reflexa* همسو است و کاهش رشد کالوس نشانی از ناسازگاری با غلظت‌های بالای کادمیوم می‌باشد [۲۲] .

منابع

[۱] امیری، ح.، فهیمی، ح.، ۱۳۸۲، بررسی اثر غلظت‌های مختلف پتاسیم در مقاومت به شوری گیاه لوبیا در کشت بافت، مجله علوم دانشگاه تهران، ۲۹: ۳۲۶-۳۱۷.

[۲] اورمزدی، پ.، چلبیان، ف.، ۱۳۸۵، مطالعه کشت بافت و اندام‌زایی در گیاه دارویی *Salvia nemorosa*، فصلنامه پژوهشی تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران، جلد ۱٤، شماره ۲، ص ۷۹-٦۹.

[۳] بهمنی، ر.، بیهمتا، م.، حبیبی، د.، فروزش، پ.، ۱۳۹۱، بررسی تغییرات جوانه‌زنی، رشد ریشه و ساقه در ژنوتیپ‌های مختلف لوبیا تحت تنش کادمیوم، دانشگاه آزاد کرج، مجله زراعت و اصلاح نباتات، شماره ٤: ۱٤٥-۱٥٤.

[٤] توکلی میاندهی، م.، مجد، ا.، ۱۳۸۸، بررسی امکان کاهش اثرات زیانبار کادمیوم بر جوانه‌زنی بذرها، تکوین دانه رست ها، توان زیستی، قدرت رویش دانه‌های گرده گیاه گوجه فرنگی با استفاده از اسید سالسیلیک *Lycopersicon esculentum (Mill.)* ،پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه آزاد واحد علوم تحقیقات تهران.

[٥] سینک، س.، چلبیان، ف.، جعفری، س.، ۱۳۸۹، مطالعه کشت بافت گیاه کنجد(*Sesamum indicum* L.)، مجله علوم پایه دانشگاه آزاد اسلامی، (JSIAU)، سال ۲۰، شماره ۷۸/۱، زمستان ۱۳۸۹.

Archive of SID

www.SID.ir

[٦] کرمی، م.، باقریه نجار، م.، اقدسی، م.، ۱۳۹۲، بهینه‌سازی شرایط باززایی گیاه لوبیا (*Phaseolus vulgaris* L.)، مجله زیست شناسی گیاهی، سال پنجم، شماره پانزدهم، بهار ۱۳۹۲،ص ١٤-١.

[۸] عابدی، ن.، پیوندی، م.، موگویی، ر.، ابراهیم زاده، م.، ۱۳۹۱، اثر کادمیوم بر رشد، عملکرد و فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان در گیاه کرچک (*Ricinus communis* L.)، پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال.

[۹] عرفانی مقدم، ز.، صبا،ج.، ۱۳۹۱، مطالعه برخی از صفات کمی موثر برعملکرد لاین‌های لوبیا چیتی، دانشگاه زنجان، نشریه پژوهش‌های حبوبات ایران، جلد ۳، شماره ۲ : ۱۱۱-۱۲۲.

[۱۰]مجد، ا.، ۱۳۸۷، کشت سلول و بافت گیاهی، جزوه درسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال.

[۱۲]یاری شورابه، م.، کریمی، ن.، قاسم پور، ح.، ۱۳۹۰، بررسی اثر استرس شوری بر روی برخی پارامترهای بیوشیمیایی وفیزیولوژیکی دو گونه *Satureja hortensis* و *Satureja avromanica* در شرایط کشت بافت،پایان نامه کارشناسی ارشد دانشکده علوم دانشگاه رازی.

[12] Ahmed, E. E., Bisztray, G. Y. D and Velicgh, I., (2002), Plant regeneration from seedling explants of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) .Acta Biologica Szegediensis, vol. 46, No. 3-4, p.27-28.

[13] Aldoobie, N. F. and Beltagi, M. S. (2013). Physiological, biochemical and molecular responses of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) plants to heavy metals stress, African Journal of Biotechnology, Vol. 12 (29), pp. 4614-4622.

[14] Azevedo, H C, Gomes. G, P, Santos. C, (2005), Cadmium Effects in Sunflower: Nutritional Imbalances in Plants and Calluses. Journal of Plant Nutrition. 28: 2221-2231.

[15] El-Shemy, A. H., Khalafalla, M., Wakasa, K. and Ishimoto, M., (2002), Reproducible transformation in two grain legumes soybean and azuki bean using different systems, Cellular and Molecular Biology, 7: 709-719.

[16] Fitzgerald, E. J., Caffrey, J. M, (2003), Copper and lead concentrations in salt marsh plants on the suir Estuary, Ireland. Environ, Pollut, 123 ,67-74.

[17] Israr, M, Sahi, SV., Jain, J., (2006), Cadmium accumulation and antioxidative responses in the *Sesbania drummondii* callus. Arch Environ Contam Toxicol 50:121-127.

[18] Kolelia, N. S, Ekerb, I, Cakmak, (2004), Effect of zinc fertilization on cadmium toxicity in durum and bread wheat grown in zinc-deficient soil. Enviroment Pollution. 131: 453-459.

[19] Malik, k. A., and Saxena, P. K., (1991), Regeneration in *Phaseolus vulgaris* promotive role of N6-benzylaminopurine in culture from juvenile leaves, Planta, 184:148-150.

[20] Matthews, D. J., Moran, B. M., (2004), Zinc tolerance, uptake, accumulation and distribution in plants and protoplasts of five European Populations of the wetland grass Glyceria fluitans, Aquat,Bot,80,39-52.

[21] Mc Clean, P. and Grafton, K. F., (1989), Regeneration of dry bean (Phaseolus vulgaris L.) via organogenesis, Plant Science 60: 117-122.

[22] Murashing, T. and Skoog, F., (1962), A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures, Plant Physiol, 15, pp. 473-497.

[23] Namjooyan, Sh., Khavari-Nejad, R., Bernard, F., Namjooyan, Sh., Piri, H., (2012), The effect of cadmium on growth and antioxidant responses in the safflower (*Carthamus tinctorius* L.) callus,Turk J Agric For(TUBITAK), 36:145-152.

[24] Nilesh, C. S., Shivendra, V. S., Jinesh, C. J., (2005), *Sesbania drummondii* cell cultures: ICP-MS determination of accumulation of Pb and Cu.Microchem J 81:163-169.

Archive of SID

www.SID.ir

[25] Padmanabhan, V., Paddock, Ef. and Sharp, WR., (1974), Plantlet formation from in vitro from Lycopersicon esculentum leaf callus, Can, J, Bot, 52:1429-1432.
[26] Shafig, M., Igbal, MZ. and Athar, M., (2008), Effect of lead and cadmium germination and seedling growth of Leucaena leucocephala. J. Sci. Environ, Manage, 12(2):61-66.
[27] Sirvastava, S., Tripathi, RD., Dwivedi, UN., (2004), Synthesis of phytochelatins and modulation of antioxidants in response to cadmium stress in *Cuscuta reflexa* –an angiospermic parasite.J Plant Physiol 161: 665-674.
[28] Veltecheva, M., Svetleva, D., Pet kova, S.P and Perl, A. (2005), In vitro regeneration and genetic transformation of common bean, Scienita Horticulturae, 107:2-10.
[29] Westhuizen, V. A., Groenewald, E. G. and Westhuizen, A. J., (1990), Root formation and attempts to establish morphogenesis callus of bean (*Phaseolus vulgaris* L.), South African Journal of Botany, 56: 271-273.
[30] Zagoskina, N. V., Goncharuk, E.A., Akyavina. A. K., (2007), Effect of Cadmium on the Phenolic compounds formation in the Callus Culture Derived from Various Organs of The Tea Plant, Russian Journal of Plant physiology, vol. 54, No. 2, pp.237-243.

Archive of SID

www.SID.ir