



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

آیدا تقی زاده قوبدل\*، 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 پذیرش: ۹۵/۱۲/۱۹

تاریخ دریافت: ۹۵/۰۹/۳۰

### چکیده

کادمیوم فلز سنگینی که مقادیر سمی آن به طور طبیعی در خاک وجود دارد و یا بوسیله فعالیت های صنعتی، معدن کاوی و کودهای کشاورزی وارد خاک می شود. گیاه لوبیا یکی از گیاهانی که توان تحمل سمیت کادمیوم را دارد. گیاه لوبیا از مهمترین اعضای تیره باقلائیان (Fabaceae) که اهمیت اقتصادی بالایی در تغذیه انسان دارد. یکی از روش های مناسب برای حفظ و ازدیاد گیاهان، بازرایی از طریق کشت بافت محسوب می شود. در پژوهش حاضر، بررسی اثرات نیترات کادمیوم و تنظیم کننده های رشد در کشت بافت گیاه لوبیا چیتی، درصد جوانه زنی، ریشه زایی و کالوس زایی بذرهای گیاه لوبیا چیتی رقم (Cos16) در محیط های دارای نیترات کادمیوم و هورمون 2ip(۲- ایزوپنتنیل آدنین) با محیط MS در قالب طرح کاملا تصادفی در آزمایشگاه مورد سنجش قرار گرفتند. در ابتدا بذرها به ترتیب: با اتانول ۷۰ درصد، آب مقطر و هیپوکلریت سدیم ۵ درصد به صورت سطحی سترون شدند. بذرهای سترون به منظور بررسی درصد جوانه زنی در محیط های 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 ۱۰ روزه ی سترون به دست آمده از کشت بذرها در محیط T0، جداکشت های برگ و محور زیر لپه تهیه شدند و در محیط های T0(MS)، T1(MS+2ip:3mg/l)، T2(MS+2ip:5mg/l)، T3(MS+NAA:0.5mg/l) +BAP:2.5mg/l، T1(MS+NAA:0.5mg/l) +BAP:2.5mg/l، T3(MS+NAA:0.5mg/l+BAP:2.5mg/l) انتقال یافتند. در نهایت کالوس های جداکشت محور زیر لپه از محیط T0 در محیط های T0(MS)، T1(MS+CdNo3:0.05mg/l)، T2(MS+CdNo3:0.1mg/l) کشت شدند. طبق نتایج، بیشترین کمترین درصد جوانه زنی به ترتیب در محیط T0(MS) و T3(MS+CdNo3:0.05mg/l)، بهترین درصد کالوس دهی در محیط T0(MS) در جداکشت محور زیر لپه مشاهده شد. بیشترین ریشه زایی در جداکشت برگ در محیط T2(MS+2ip:5mg/l) و بهترین کالوس زایی و ریشه زایی در جداکشت محور زیر لپه در محیط T3(MS+NAA:0.5mg/l +BAP:2.5mg/l) صورت گرفت. سرانجام در کشت کالوس های محور زیر لپه، بهترین کالوس و بیشترین ریشه زایی 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.

**کلیدواژه ها:** کادمیوم، لوبیا، ۲- ایزوپنتنیل آدنین، α- نفتالین استیک اسید، ۶- بنزیل آمینوپورین

## 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، می توانند غذای کاملی برای انسان باشند، عملکرد دانه در گیاهان زراعی یکی از مهمترین صفات مورد ارزیابی و بسیار مورد توجه اصلاح گران 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 می تواند سوء تغذیه و کمبود پروتئین را برطرف سازد. قسمتی از کمبود پروتئین را می توان به وسیله مصرف حبوبات جبران نمود. لوبیا یکی از مهمترین حبوبات است که در ایران سطح کشتی بالغ بر ۱۲۴۰۰۰ هکتار دارد، ارزش بالای این محصول شامل ۲۵٪ پروتئین و ۶۰٪ کربوهیدرات است که سبب شده سهم عمده ای را در جیره غذایی انسان به خود اختصاص دهد [۳]. آلودگی خاک به فلزات سنگین به ویژه با ورود پساب های آلوده و استفاده بی رویه از کودهای فسفاته دارای کادمیوم یک مشکل فزاینده می باشد. دوام بلندمدت زیستی و باقی ماندن در خاک سبب انباشته شدن این فلزات در زنجیره غذایی و در نتیجه تاثیرات منفی بالقوه برای سلامتی انسان می گردد. 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 پروتون ها به محیط ریشه بستگی دارد. آزمایش های

مسمومیت گیاهی ناشی از سمیت فلزات برای برخی از گونه های خشکی زی گیاهان گزارش شده است [۷]. کادمیوم اگرچه یک عنصر غذایی ضروری نیست اما به سهولت از طریق ریشه های گیاه جذب و با غلظتی که برای زنجیره غذایی خطرناک است، در گیاه ذخیره می شود. تجمع کادمیوم در بافت های گیاهی در سطح سلولی نیز می تواند سمی باشد و موجب کاهش رشد گردد. بنابراین جلوگیری از جذب کادمیوم توسط ریشه های گیاه می تواند یک راهکار مهم در به حداقل رساندن اثرات زیان بار زیستی 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 برگ ها، ساقه ها و ریشه ها می باشد. حلالیت و در دسترس بودن فلزات برای گیاهان ممکن است توسط چندین عامل از قبیل سرعت برداشت آنها، ویژگی های شیمیایی، pH، بافت خاک، مواد آلی موجود در آن، ظرفیت تبادل کاتیونی و غیره که تعیین کننده جذب از راه های مختلف توسط گونه های مختلف و در مکان های مختلف است، تحت تاثیر قرار گیرد. کادمیوم اغلب در ریشه های گیاهان تجمع می یابد و مقدار اندکی به برگ ها منتقل می شود [۱۵-۱۹]. جذب کادمیوم توسط گیاه به سیستمی وابسته است که نه تنها از نظر متابولیسمی بیشتر حالت واسطه دارد بلکه با سیستم های جذب سایر عناصر نیز رقابت می کند [۱۳].

از آنجایی که گیاه لوبیا (*Phaseolus vulgaris* L.) گیاهی بیش اندوز در رابطه با کادمیوم و سرب می باشد [۱۲] در این پژوهش مورد توجه قرار گرفته است. نظر

گروه‌های مختلف تحت تیمار سنجش و مقایسه شد.

### بررسی مراحل باززایی

پس از هجده روز که دانه رست‌ها به حد مناسبی رشد کردند جداگشت‌های مختلف شامل: قطعات برگ و محور زیر لپه از آنها تهیه شد. بررسی مراحل باززایی در گیاه، قطعات جداگشت برگ و محور زیر لپه به طور جداگانه، با هشت تکرار و سه عدد جداگشت 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 و ریشه‌زایی جداگشت‌ها پس از یک تا دو ماه بررسی شدند. تعدادی از جداگشت‌های محور زیر لپه با هشت تکرار و سه عدد جداگشت در هر شیشه، با تیمارهای متفاوت (NAA: 0.5 mg/l + MS) T1 و (BAP:2.5 mg/l + MS) T2 و (BAP:2.5mg/l + NAA: 0.5 mg/l + MS) T3 منتقل شدند. نتایج کالوس‌زایی و ریشه‌زایی جداگشت‌ها از یک هفته تا یک ماه پس از کشت ثبت شدند.

### بررسی اثر نیترات کادمیوم بر باززایی

جداگشت‌های 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 (2ip: 0.1 mg/l+MS) T2 با شش تکرار و سه جداگشت در هر پلیت، واگشت شده و به اتاق کشت انتقال داده شدند.

### تحلیل داده‌ها

همه آزمایش‌ها به صورت فاکتوریل در قالب طرح

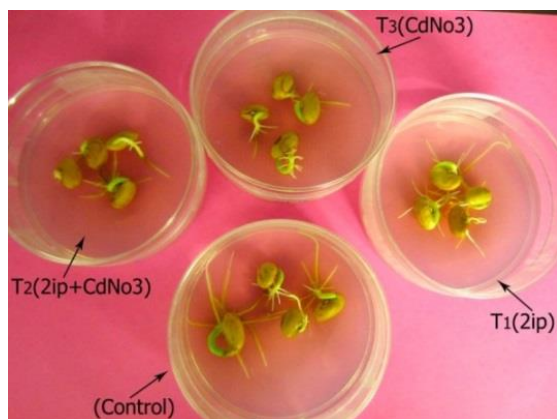
به اهمیت لوبیا به عنوان مهم‌ترین گیاه زراعی در تیره باقلانیان و حساسیت آن به خشکی و شوری خاک، با بهینه‌سازی کشت بافت این گیاه می‌توان زمینه را برای افزایش مقاومت گیاه به تنش‌های محیطی فراهم آورد. تاکنون با استفاده از هورمون‌های مختلف باززایی گیاه لوبیا به دفعات انجام گرفته و هدف بیشتر آنها مطالعه کالوس‌ها 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

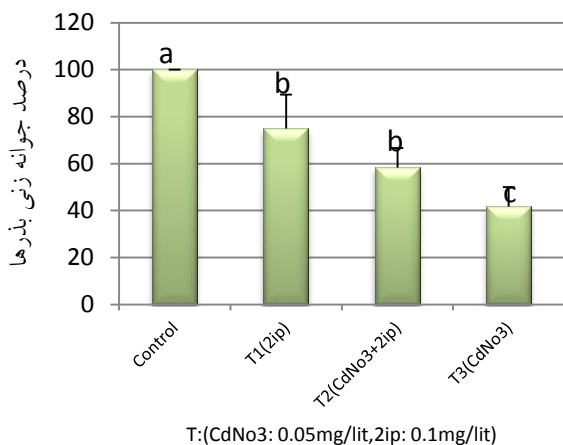
گیاه مورد بررسی در این پژوهش، لوبیا چیتی رقم Cos16 بود. بذرهای مورد نظر از سازمان معاونت زراعت جهاد کشاورزی تهران در سال ۱۳۹۴ تهیه شدند. بذرهای لوبیا پس از شستشو، ابتدا برای سترون‌سازی سطحی به مدت ۳ دقیقه در اتانول ۷۰ درصد و سپس ۲ دقیقه در آب مقطر و در نهایت ۹۰ ثانیه در هیپوکلریت سدیم ۵ درصد قرار گرفتند. 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 و (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 ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی، در دمای ۲۸ تا ۳۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. پس از یک هفته درصد جوانه‌زنی در



شکل ۱- مقایسه آغاز جوانه زنی بذرها در نمونه های شاهد (Control :T0) و تحت تیمار (T:Treatment) (روز هفتم)



شکل ۲- درصد جوانه زنی بذرها لوبیا در نمونه های شاهد (Control :T0) و تحت تیمار (T:Treatment) (روز هفتم)

جدول ۱: تجزیه واریانس (ANOVA) درصد جوانه زنی (GR) تحت تیمارهای متفاوت نیترات کادمیوم و هورمون 2ip (روز هفتم).

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			

کاملاً تصادفی انجام شد که در آنها آثار اصلی شامل تیمارهای هورمونی و انواع قطعات جداگشت بود. تجزیه و تحلیل داده ها 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.

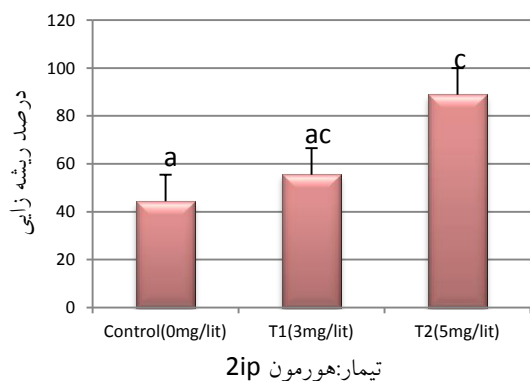
## نتایج

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

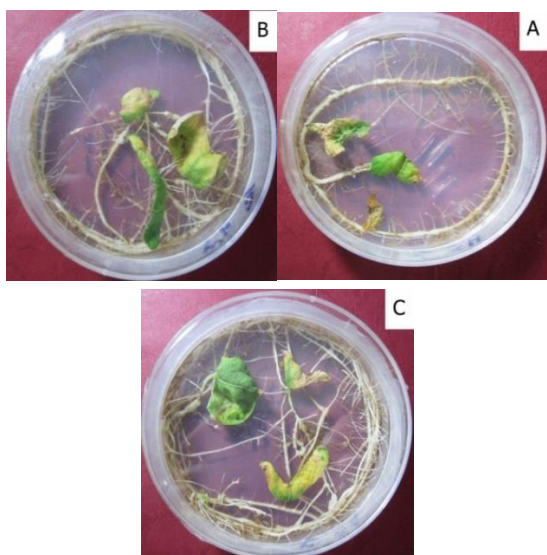
در این مطالعه، بررسی جوانه زنی دانه رسته های لوبیا با آغاز جوانه زنی اولین بذرها در روز سوم تا آخرین جوانه زنی در روز هفتم پس از اعمال تیمارها ادامه یافت (شکل ۱). نتایج حاکی از آن است که تفاوت درصد جوانه زنی بذرها بین نمونه شاهد (Control :T0) و تیمار (T3) نیترات کادمیوم در سطح ۵٪ معنی دار شد. بیشترین درصد جوانه زنی مربوط به نمونه شاهد (T0) ۱۰۰٪ و کمترین درصد جوانه زنی مربوط به تیمار (T3) نیترات کادمیوم ۴۱/۶۶٪ است (شکل ۲).

### بررسی تاثیر هورمون 2ip بر جداگشت های برگ

بررسی ها در روز بیست و هشتم پس از کشت جداگشت ها نشان داد که تفاوت درصد کالوس زایی جداگشت های برگ در تیمار (T2) و نمونه شاهد (Control :T0) در سطح ۵٪ معنی دار است. بطور کلی، کمترین درصد کالوس زایی مربوط به نمونه شاهد (T0) ۳۳/۳٪ و بیشترین درصد کالوس زایی مربوط به نمونه تیمار (T2) ۷۷/۷۳٪ می باشد. (شکل ۳)



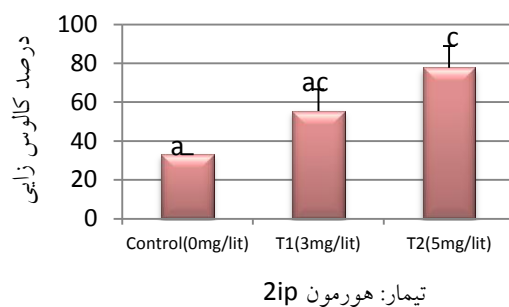
شکل ۵ - درصد ریشه زایی جداگشت های برگي در نمونه های شاهد (Control :T0) و تحت تیمار (T:Treatment)، تحت تاثیر هورمون 2ip (روز چهل و دوم)



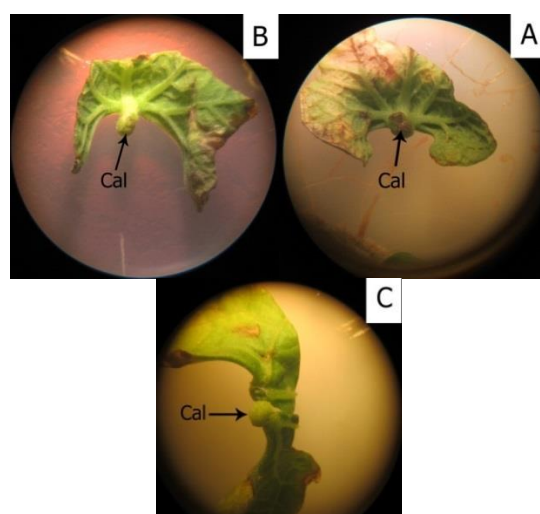
شکل ۶ - مقایسه ریشه زایی جداگشت های برگي در نمونه های شاهد (Control :T0) و تحت تیمار (T:Treatment) (روز چهل و دوم) A: (Control) T0، B: (2ip: 3mg/l) T1، C: (2ip: 5mg/l) T2.

### بررسی تاثیر هورمون 2ip بر جداگشت های محور زیر لپه

هشت روز پس از کشت جداگشت ها شروع کالوس زایی مشاهده شد و نتایج نشان داد که کمترین درصد کالوس زایی مربوط به تیمار (T1) ۳/۳۳٪ و بیشترین درصد کالوس زایی را نمونه شاهد (T0) ۸۸/۸۶٪ داشته است. تفاوت درصد کالوس زایی



شکل ۳ - مقایسه درصد کالوس زایی جداگشت های برگي در نمونه های شاهد (Control :T0) و تحت تیمار (T:Treatment) تحت تاثیر هورمون 2ip (روز بیست و هشتم)

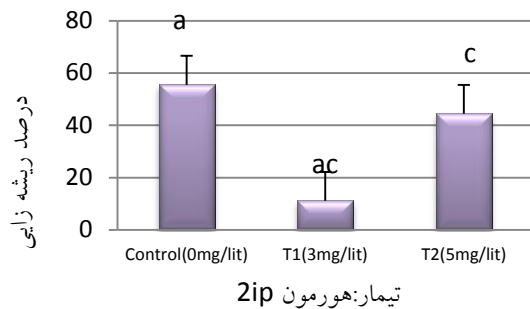


شکل ۴ - مقایسه کالوس زایی جداگشت های برگي در نمونه های شاهد (Control :T0) و تحت تیمار (T:Treatment) (روز بیست و هشتم)، (Cal: کالوس)، A: (Control) T0، B: (2ip: 3mg/l) T1، C: (2ip: 5mg/l) T2.

در (شکل ۴): تیمار (T2) رنگ کالوس سبز، در تیمار (T1) رنگ کالوس سبز تیره و نمونه شاهد (T0) رنگ کالوس قهوه ای می باشد.

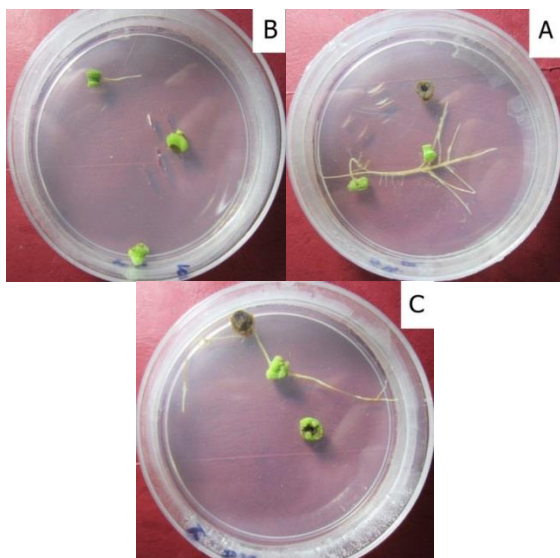
بررسی ها در روز چهل و دوم پس از کشت جداگشت ها نشان داد که، کمترین درصد ریشه زایی مربوط به نمونه شاهد (Control) ۴/۴۴٪ و بیشترین درصد ریشه زایی در تیمار (T2) ۸۸/۸۶٪ می باشد و اختلاف درصد ریشه زایی جداگشت های برگي در تیمار (T2) و نمونه شاهد (T0) در سطح ۵٪ معنی دار است. (شکل ۵)

به تیمار (T1) ۱/۱۱٪ و بالاترین درصد ریشه‌زایی در نمونه شاهد (T0) ۵/۵۵٪ می‌باشد. تفاوت در صد ریشه‌زایی جداگشت های هیپوکوتیل درنمونه شاهد و تیمار (T2) در سطح ۵٪ معنی دار است. (شکل ۹)



شکل ۹- مقایسه اثر هورمون 2ip بر درصد ریشه زایی جداگشت های محور زیر لپه درنمونه های شاهد

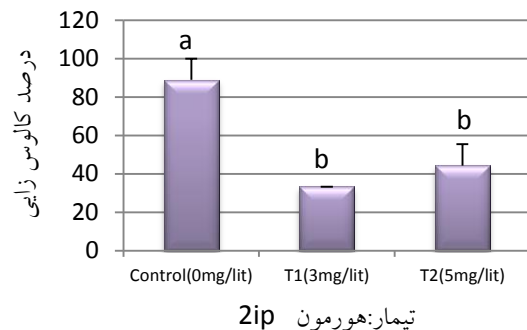
(Control :T0) و تحت تیمار (T:Treatment) (روز بیست و هشتم)



شکل ۱۰- مقایسه ریشه زایی جداگشت های محور زیرلپه در نمونه های شاهد (Control :T0) و تحت تیمار (T:Treatment) (روز بیست و هشتم)، A: (Control) T0 : A، (روز بیست و هشتم)، B: (2ip: 3mg/l) T1: B، C: (2ip: 5mg/l) T2: C.

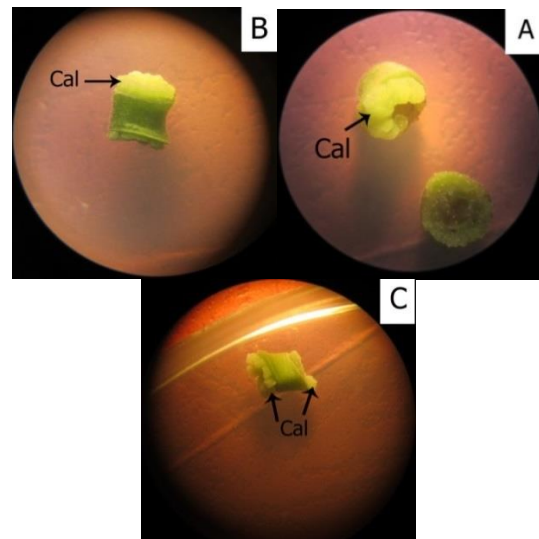
بررسی تاثیر هورمون های NAA و BAP بر جداگشت های محور زیرلپه یک هفته پس از کشت جداگشت ها، کمترین

جداگشت های محور زیر لپه در نمونه شاهد در مقایسه با سایر تیمارها در سطح ۵٪ معنی دار است. (شکل ۷)



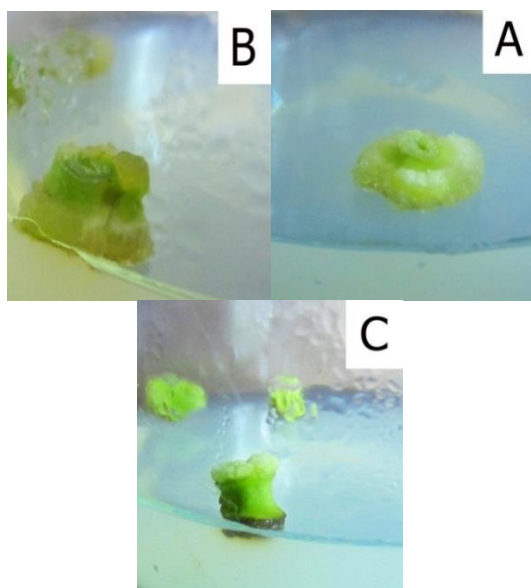
شکل ۷- مقایسه اثر هورمون 2ip بر درصد کالوس زایی جداگشت های محور زیر لپه درنمونه های شاهد (Control :T0) و تحت تیمار (T:Treatment) (روز هشتم)

در (شکل ۸) در نمونه شاهد (T0) رنگ کالوس سبز متمایل به سفید، در تیمار (T2) رنگ کالوس سبز و تیمار (T1) رنگ کالوس سبز می‌باشد.

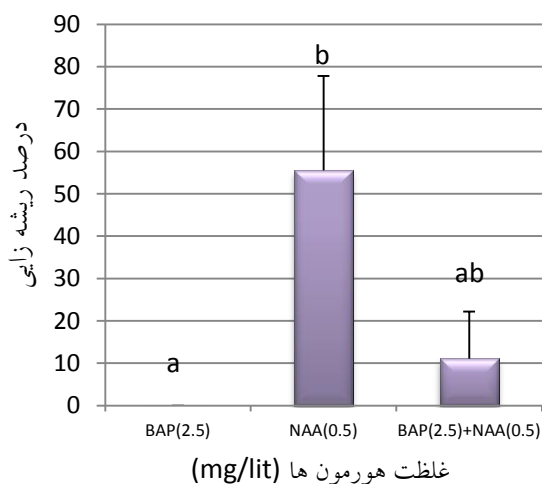


شکل ۸- مقایسه کالوس زایی جداگشت های محور زیرلپه در نمونه های شاهد (Control :T0) و تحت تیمار (T:Treatment) (روز هشتم)، A: (Control) T0 : A، (روز هشتم)، B: (2ip: 3mg/l) T1: B، C: (2ip: 5mg/l) T2: C.

بررسی ها در روز بیست و هشتم پس از کشت، مشخص کردند که کمترین درصد ریشه‌زایی مربوط



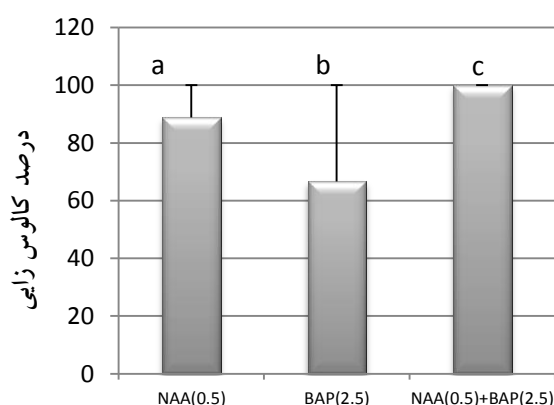
شکل ۱۲- مقایسه کالوس زایی جداگشت های هفت روزه محورزیرپه تحت تاثیر هورمون های متفاوت  
A : (NAA 0.5mg/l+BAP 2.5mg/l) ،  
B : (NAA 0.5mg/l) ، C : (BAP 2.5mg/l) .



شکل ۱۳- مقایسه اثر هورمون های NAA+BAP, BAP, NAA بر درصد ریشه زایی جداگشت های هفت روزه محور زیرپه

بررسی های یک ماه پس از کشت، بیشترین درصد ریشه زایی را در تیمار (BAP +NAA 0.5 mg/l :T3) ۸۸/۸۶٪ و کمترین درصد ریشه زایی را در تیمار (BAP 2.5 mg/l :T2) صفر درصد نشان داد. تفاوت درصد ریشه زایی جداگشت ها در تمامی

درصد کالوس زایی در تیمار (BAP 2.5 mg/l :T2) ۶۶/۶٪ و بیشترین درصد کالوس زایی در تیمار (BAP2.5 mg/l + NAA0.5 mg/l :T3) ۱۰۰٪ دیده شد. اختلاف درصد کالوس زایی جداگشت های محور زیرپه در تمامی تیمارها در سطح ۵٪ معنی دار است. (شکل ۱۱)



غلظت هورمون ها (mg/lit)

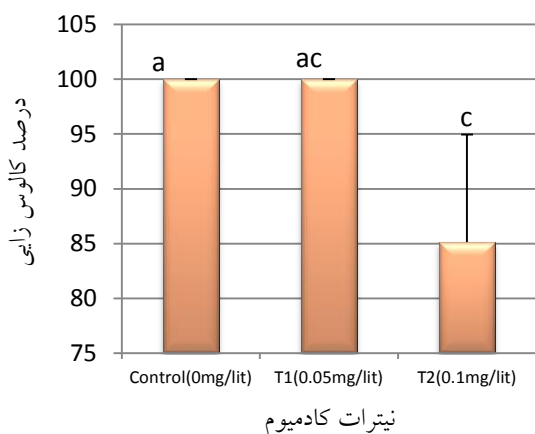
شکل ۱۱- مقایسه اثر هورمون های NAA+BAP, BAP, NAA بر درصد کالوس زایی جداگشت های هفت روزه محور زیرپه

رنگ کالوس ها در روز هفتم (شکل ۱۲) نشان می دهد، در تیمار (BAP+ NAA :T3) رنگ کالوس سبز روشن متمایل به سفید، در تیمار (NAA: T1) کالوس به رنگ سبز و تیمار (BAP: T2) رنگ کالوس سبز دیده شد.

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



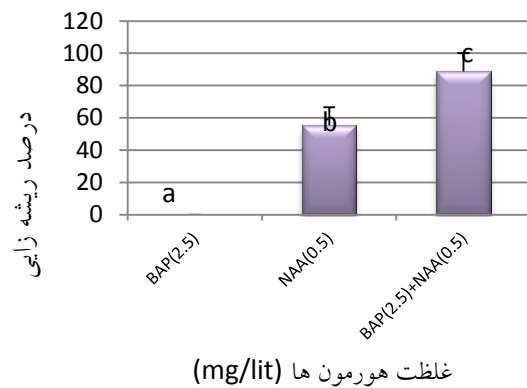
محور زیر لپه بیشترین درصد کالوس زایی جداگشت ها در نمونه شاهد (Control: T0) و تیمار (T1) ۱۰۰٪ و کمترین درصد کالوس زایی را در تیمار (T2) ۸۵/۱۳٪ نشان داد. تفاوت درصد کالوس زایی جداگشت های محور زیر لپه حاصل از واکشت در نمونه شاهد (T0) و تیمار (T2) در سطح ۰.۵٪ معنی دار است. (شکل ۱۶)



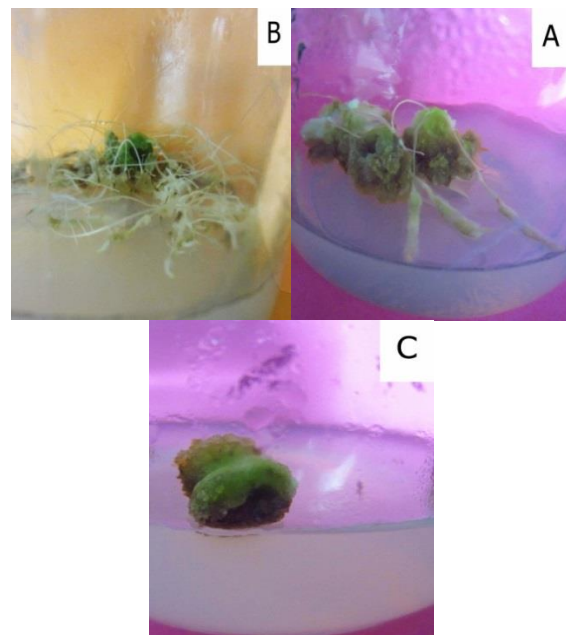
شکل ۱۶- مقایسه درصد کالوس زایی جداگشت های سی و پنج روزه محور زیر لپه در غلظت های مختلف نیترات کادمیوم  
 (Control) T0  
 (CdNo3: 0.05mg/l) T1  
 (CdNo3: 0.1mg/l) T2

شکل (۱۷) نشان دهنده آن است که: رنگ کالوس در نمونه شاهد (T0) سبز- مایل به قهوه ای داشته است، در تیمار (T1) رنگ کالوس سبز مایل به قهوه ای روشن داشت و تیمار (T2) کالوس قهوه ای بود. چهل و پنج روز پس از واکشت جداگشت ها، نتایج نشان داد که کمترین درصد ریشه زایی مربوط به تیمار (T2) ۲۲/۲٪ و بالاترین درصد ریشه زایی در نمونه شاهد (Control) ۴۴/۴٪ است. اختلاف درصد ریشه زایی جداگشت ها در نمونه شاهد و تیمار (T2) در سطح ۰.۵٪ معنی دار است (شکل ۱۸).

تیمارها در سطح ۰.۵٪ معنی دار می باشد (شکل ۱۴). در شکل ۱۵ می توان مقایسه ریشه زایی جداگشت های محور زیر لپه را تحت تیمارهای متفاوت مشاهده کرد.



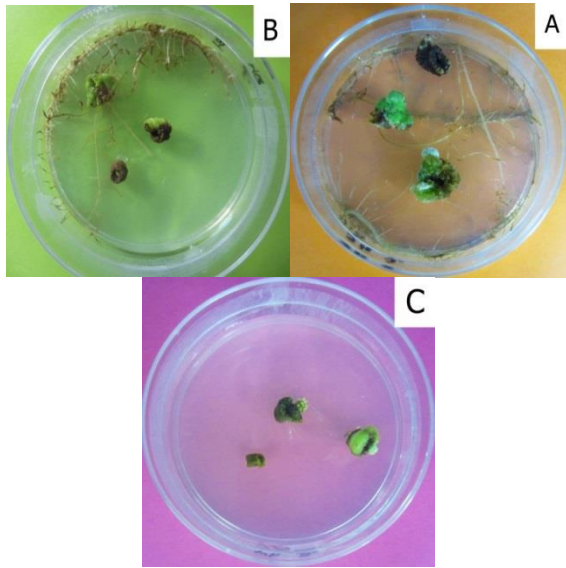
شکل ۱۴- مقایسه اثر هورمون های NAA، BAP، NAA+BAP بر درصد ریشه زایی جداگشت های سی روزه محور زیر لپه



شکل ۱۵- مقایسه ریشه زایی جداگشت های سی روزه محور زیر لپه تحت تاثیر هورمون های متفاوت  
 A : (NAA 0.5mg/l + BAP 2.5mg/l) ، B : (NAA 0.5mg/l) ، C : (BAP 2.5mg/l)

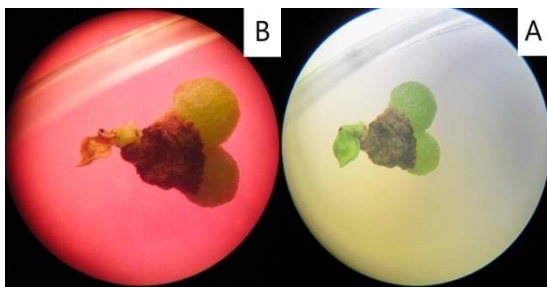
بررسی تاثیر نیترات کادمیوم بر کالوس های محور زیر لپه  
 سی و پنج روز پس از واکشت جداگشت های





شکل ۱۹- مقایسه ریشه‌زایی جداگشت‌های چهل و پنج روزه محور زیر لپه در غلظت‌های مختلف نیترات کادمیوم، (Control) T0:A ، T1 (0.05mg/l CdNo3): B ، T2 (CdNo3:0.1mg/l):C.

در (شکل ۲۰) تیمار (T2) از جداگشت محور زیر لپه، برگ‌گی سبز در ابتدا ظاهر شد، اما با گذشت زمان برگ رو به زردی رفت که این مسئله نشان دهنده اثر منفی نیترات کادمیوم با غلظت بالا بر جداگشت‌های محور زیر لپه می‌باشد.

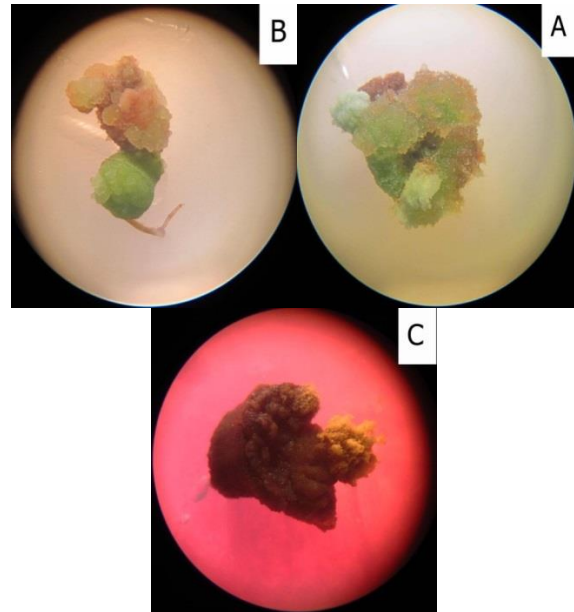


شکل ۲۰- مقایسه زرد شدن برگ حاصل از جداگشت محور زیر لپه در غلظت ۰/۱ میلی گرم در لیتر نیترات کادمیوم در مدت زمان ۳۵ (روز)، (A) برگ سبز (روز پانزدهم) (B) برگ تقریباً زرد شده (روز پنجاهم)

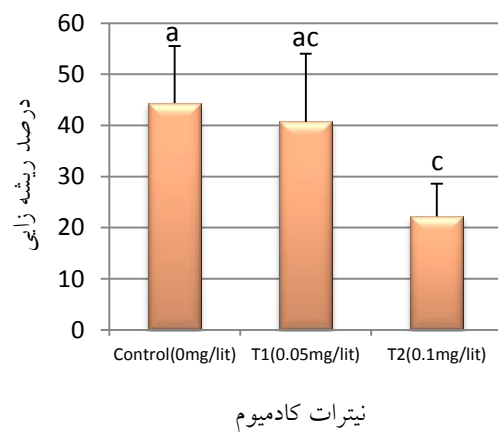
### بحث و نتیجه‌گیری

نتایج درصد جوانه زنی نشان داد که تیمار نیترات

در شکل (۱۹) ریشه‌زایی واکشت جداگشت‌های محور زیر لپه در غلظت‌های مختلف نیترات کادمیوم مقایسه شده است.



شکل ۱۷- مقایسه کالوس‌زایی جداگشت‌های سی و پنج روزه محور زیر لپه حاصل از واکشت آنها در غلظت‌های مختلف نیترات کادمیوم (Control) T0:A ، T1 (CdNo3:0.05mg/l): B ، T2 (CdNo3: 0.1mg/l):C.



شکل ۱۸- مقایسه درصد ریشه‌زایی جداگشت‌های چهل و پنج روزه محور زیر لپه در غلظت‌های مختلف نیترات کادمیوم (Control) T0: (CdNo3: 0.05mg/l) T1 ، T2 (CdNo3: 0.1mg/l):C.

[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 و محیط‌های متفاوت برای موفقیت در کشت بافت گیاه لوبیا را مشخص می‌سازند.

نتایج بررسی‌های تاثیر هورمون‌های NAA و BAP بر جداکشت‌های محور زیرلپه حاکی از آن است که بیشترین درصد کالوس‌زایی در تیمار (BAP+NAA) و تیمار (NAA) و کمترین درصد کالوس‌زایی در تیمار (BAP) می‌باشد و در رابطه به ریشه‌زایی، بیشترین درصد ریشه‌زایی در تیمار (BAP+NAA) دیده شد و ریشه‌زایی در تیمار (BAP) محسوس نبود. طبق تحقیقات یاری شورابه و کریمی در سال ۱۳۹۰، بالاترین درصد کالوس‌زایی مربوط به ریز نمونه محور زیرلپه می‌باشد و بهترین کالوس‌ها در تیمار هورمونی متشکل از دو هورمون سیتوکینینی و اکسینی ایجاد می‌شوند [۱۰]. تحقیقات کرمی و همکاران 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 ۰/۴ میلی‌گرم در لیتر هورمون NAA است. در غلظت ۰/۴ 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 و اکسین به کاربرد

کادمیوم T3 ( $CdNo3: 0.05 \text{ mg/l}$ ) نسبت به دیگر نمونه‌ها باعث کاهش جوانه زنی در بذرها شد که این امر می‌تواند نشان دهنده تجزیه مواد غذایی ذخیره شده دانه در اثر کاربرد کادمیوم و همچنین نتیجه کاهش جذب آب و تخریب ساختار پروتئین‌هایی باشد که در جذب آب شرکت دارند [۲۵].

در نتایج حاصل از بررسی تاثیر هورمون Zip بر جداکشت برگ و محور زیرلپه بیشترین کالوس‌زایی و ریشه‌زایی جداکشت برگ در غلظت ۵ میلی‌گرم در لیتر هورمون Zip و بیشترین کالوس‌زایی و ریشه‌زایی در جداکشت محور زیرلپه در غلظت صفر میلی‌گرم در لیتر هورمون Zip 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 گسترده‌تر، 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 محیط کشت و در شرایط محیطی مساوی نور، دما و رطوبت نتایج کالزایی متفاوتی را نشان می‌دهند و تمامی جداکشت‌های مشابه در این شرایط نتایج تقریباً یکسانی را آشکار می‌سازند. می‌توانیم نتیجه‌گیری کنیم که تفاوت نتایج حاصل مربوط به تفاوت نوع جداکشت‌های می‌باشد. این تفاوت می‌تواند مربوط به میزان ذخایر و به ویژه هورمون‌های درون‌زا (آندوژن)، سن تاحدی متفاوت جداکشت‌ها و میزان قطبیت حاکم بر آن‌ها باشد [۹]. پژوهشگران در بررسی‌های خود جداکشت‌های متفاوتی را برای مراحل از کشت بافت گیاه لوبیا مناسب گزارش کرده‌اند که از جمله می‌توان: Saxena, Malik (۱۹۹۱)

شده دارد [۲۴]. بسیاری از گونه‌های باقلاتیان 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 جداگشت محور زیرلپه گیاه لوبیا رقم ناز در غلظت ۵ میلی‌گرم در لیتر هورمون 2,4-D و ۲/۵ میلی‌گرم در لیتر هورمون Kin به دست آوردند. قابل تامل است که هورمون‌های BAP و NAA نسبت به هورمون‌های 2,4-D و Kin، هورمون‌های ضعیف تری محسوب می‌شوند [۱].

مطالعات تاثیر نیتراکادمیوم بر واگشت جداگشت‌های محور زیرلپه نشان دادند که بهترین کالوس‌زایی و ریشه‌زایی در نمونه شاهد و تیمار نیتراکادمیوم (۰/۰۵ میلی‌گرم در لیتر) و کمترین کالوس‌زایی و ریشه‌زایی در تیمار نیتراکادمیوم (۰/۱ میلی‌گرم در لیتر) دیده شد که این نشان دهنده اثر بازدارنده نیتراکادمیوم می‌باشد. این نتایج با گزارش‌های (Zagoskina and et al., 2007) برگ‌گیاه tea plant (*Camellia sinensis* L.) همسو می‌باشد که تاثیر نیتراکادمیوم بر کالوس‌های تهیه شده از برگ و ساقه، نشان دهنده آن است که کادمیوم وسعت توده کالوسی را کاهش می‌دهد و در کالوس‌های حاصل از ریشه تغییری مشاهده نمی‌شود و در نهایت در غلظت‌های خیلی بالای کادمیوم محیط‌کشت و کالوس از بین می‌روند [۲۹]. تاثیر کادمیوم ناسازگاری‌هایی را در رشد کالوس ایجاد می‌کند که این رفتار به غلظت آن بستگی دارد و کاهش 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]

### 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 ۱۴، شماره ۲، ص ۷۹-۶۹.
- [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 ۴: ۱۴۵-۱۵۴.
- [۴] 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 سالیسیلیک *Lycopersicon esculentum* (Mill.)، پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه آزاد واحد علوم تحقیقات تهران.
- [۵] 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.

- 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.
- [۶] 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 ۱۴-۱.
- [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 بر عملکرد 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 و فیزیولوژیکی دو گونه *Satureja avromanica* و *Satureja hortensis* 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

- [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] Shafiq, M., Iqbal, 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] Zagorskina, 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.