ارزیابی گیاهان جهش یافته در برموداگرس با تمرکز بر بهبود پالایندگی سرب

مینا تقی زاده[1*]، محسن کافی[2]، محمدرضا فتاحی مقدم[3]
۱-استادیار گروه علوم باغبانی، دانشگاه اراک، اراک. ۲- استاد گروه علوم باغبانی، دانشگاه تهران، کرج.
۳- دانشیار گروه علوم باغبانی، دانشگاه تهران، کرج.

چکیده

اخیرا استفاده از گیاهان تجمع کننده فلزات سنگین برای پالایش مناطق آلوده بسیار مورد توجه قرار گرفته است. هدف این پژوهشبررسی مقاومت و پالایندگی چمن برموداگرس به سرب، استفاده از تنوعالقایی و ردیابی مولکولی در گیاهان تکثیر شده بود. در این آزمایش گیاهان حاصل از جنین زایی، اندام زایی، بذور با/بدون تیمار EMS نسبت به سرب گزینش و سپس در معرض سرب قرار گرفتند. نتایج نشان داد برخی واریته های سوماکلونال افزایش تجمع، یک گروه افزایش دفع و سایر واریته ها عدم تغییر در صفت تجمع کنندگی سرب نشان دادند. نتایج نشان داد که واریته های جدید بدست آمده از روش گزینش درون شیشه ای، سرب بیشتری را نسبت به واریته های حاصل از بذور تحت تیمار EMS جذب کردند. نشانگر RAPD به منظور ارزیابی الگوی ژنتیکی گیاهان حاصل از مسیرهای مختلف القایی مورد استفاده قرار گرفت. الگوی باندی RAPD در آغازگر BB08 یک باند با اندازه تقریبی ۲۱۰۰ جفت باز در واریته جاذب و تجمع کننده را آشکار نمود که این می تواند برای شناسایی نمونه های پالاینده مورد شناسایی قرار گیرد. بهبود تجمع سرب اندام هوایی در بهترین واریته تجمع کننده و جذب سرب نشان دهنده گزینش موفقیت آمیز به منظوراصلاح برموداگرس می باشد که برای اهداف گیاه پالایی می تواند مورد استفاده قرار گیرد.

واژگان کلیدی: چمن- فلزات سنگین- گیاه پالایی- تنوع سوماکلونال-RAPD

مقدمه

امروزه آلودگی فلزات سنگین یکی از مشکلات مهم محیط زیست می باشد (Alloway, 1990). در بین فلزات سنگین، سرب یکی از مهمترین آلاینده ها است که با کاربرد روشهایی باید آن را از محیط زیست پالایش نمود(Huang, et al., 1997). اخیرا استفاده از گیاهان تجمع دهنده فلزات سنگین (گیاهان فراانباشت) برای پالایش مناطق آلوده مورد توجه محققین قرار گرفته است (McGrath & Zhao, 2003).روش های اصلاح سنتی برای مقاومت به تنش های غیر زیستی و زیستی به دلیل نیاز به زمان، فضا و نیروی کار زیاد بسیار مشکل است. (Skirvin, et al. 1993; Alibert, et al. 1994).کشت های درون شیشه ای به عنوان منبعی برای القا تغییرات ژنتیکی و به دنبال آن انتخاب درون شیشه ای در اصلاح بسیاری از گیاهان در بهبود مقاومت به تنش های محیطیمورد استفاده قرار گرفته است (Bajji, et al., 2000; Tewary, et al., 2000).بر همین اساس محققان توانسته اند در زمینه پژوهش های اصلاح درون شیشه ای با هدف القا تنوع سوماکلونال، گیاهان مقاوم به برخی فلزات از جمله آلومینیوم، مس، روی، منگنز، کادمیم و نیکل و سایر فلزات را پیدا کنند (Bojarczuk, 2004; Gatti, 2008).

علاوه برالقاتنوع درون شیشه ای سوماتیکی، اصلاح توسط مواد جهش زا از طریق پرتوتابی با اشعه و یا مواد شیمیایی نقش مهمی را در بهبود عملکرد و کیفیت محصولات چه بصورت مستقیم و چه بصورت تکمیلی در روش‌ها یاصلاحسنتی دارد(et al., 2007 Khawale ;Latado et al., 2004). کشور ما به دلیل دارا بودن مراکز صنعتی گسترده، معادن و تعدد وسایل نقلیه دچار بحران های زیست محیطی می باشد، لذا شناسایی گونه های سازگار با شرایط آب و هوایی شهرهای ایران نخستین گام جهت استفاده از این روش ها در رفع آلودگی های کشور خواهد بود. چمن ها به عنوان عنصری مهم در فضای سبز علاوه بر نقش زیبایی به دلیل داشتن رشد گسترده و تولید مقادیر بالای زیست توده، می توانند به عنوان یک گیاه پالاینده مورد استفاده قرار گیرد. با این وجود پژوهشیبه منظور ارزیابی مقاومت، میزان پالایندگی چمن به آلاینده ها والقا جهش های برای افزایش پالایندگی به فلزات سنگین در دسترس نمی باشد.با توجه به اینکه برموداگرس یکی از چمن های مقاوم به شرایط خشکی و گرما می باشد در این تحقیق تلاش شد که با استفاده از

القا تنوع سوماتیکی در شرایط درون شیشه ای و تیمار بذر با مواد جهش زا توان مقاومت و پالایش را افزایش و ارزیابی ژنومی گیاهان مقاوم و پالایشگر سرب با استفاده از نشانگر RAPD انجام گرفت.

مواد و روشها

بذرمورد استفاده در این پژوهش چمنبرمواگرسواریته 'dactylon' بود. در این آزمایش به منظور افزایش میزان مقاومت و پالایندگی در برمواگرس بذر، کالوس های جنین زا و شاخساره زا تحت تیمارهای مختلف القای جهش قرار گرفتند . در این آزمایش هر مسیر به عنوان یک تیمار در نظر گرفته شد ویکسری صفات رویشی، غلظت[1] سرب در اندام هوایی و میزان جذب سرب[2] (غلظت سرب در اندام هوایی× وزن خشک اندام هوایی)با دستگاه جذب اتمی اندازه گیری شدند. نوع طرح آماری مورد استفاده در این آزمایش طرح کاملا تصادفی با تکرارهای نامساوی برای هر تیمار بود. به منظور بررسی الگوی ژنتیکی تنوع القایی درونشیشه ای وتنوع حاصل از تیمارEMSدرگیاهان رشد یافته برمواگرس وگزینش شده نسبت به حضور سرب در محیط که طی مسیرهای مختلف حاصل شده بودندبه همراه شاهد استفاده شد. روش استخراج بااستفاده از روشد لاپورتا وهمکاران (۱۹۸۳) با اندکی تغییرات برای تعیین بهترین روش استخراجDNAبرمواگرس انجام گرفت. سازانجامآزمایشRAPD،برایبررسیچندشکلیبیننمونههاتنهانتایجآغازگرهاییواردآنالیزشدندکهازوضوحوتکرارپذیریبالاییبرخورداربودند. بررسیپروفایلژنتیکیگیاهانحاصلازمسیرهایمختلفالقاییوشاهدبامقایسهباندهایصفرویکتشکیلشدهدرآغازگرهاانجامگرفت.به منظور بررسی فراوانی تنوع ژنتیکی در مسیر القای درون شیشه ای (کشت بافت) و برون شیشه ای (تیمار EMS) الگوی باندی تغییر یافته در واریته های مقاوم به سرب و شاهد با استفاده از داده های مولکولی RAPD مورد مقایسه قرار گرفت. باندهای اسکور شده هر مسیر بر اساس تعداد واریته های غربالگر شده به سرب در تعداد کل باندهای تکثیر شده هر مسیر القایی محاسبه گردید و سپس فراوانی تنوع برای هر مسیر القایی محاسبه شد.

نتایج و بحث

در بررسی تک گیاهان حاصل از تیمارهای مختلف القایی یکسری صفات متمایز نسبت به شاهد مشاهده شد و صفاتیمانند میزان غلظت و جذب سرب که نشان دهنده یکی از ویژگی های مهم پالاینده های گیاهی است، مورد توجه قرار گرفت. در طی مسیر جنین زایی برمواگرس القا تنوع سوماکلونال منجر به ایجاد گیاه شماره Emb2 گردید که توانست علاوه بر داشتن یکسری تفاوت های مورفولوژیکی بیشترین تجمع سرب را در اندام های هوایی نسبت به سایر نمونه ها داشته باشد. همچنین گیاه Org5 بیشترین وزن تر و خشک یا به عبارتی بیشترین زیست توده را در میان گیاهان مورد بررسی تولید نمود ولی به دلیل عدم تجمع چندان سرب در اندام ها، میزان جذب سرب در آن زیاد نبود. بگونه ای عکس در گیاه Org2 علاوه بر زیست توده نسبتا خوب، میزان جذب نیز در آن بالا بود و در کل بیشترین جذب را در بین گیاهان و نسبت به شاهد داشت. بطور کلی تنوع زیادی در صفات ظاهری گیاهان مانند تعداد و قطر دستک، طول و عرض برگ، طول میانگره و وزن تر و خشک بین تیمارهای القایی مشاهده گردید که با نتایج سایر محققان مبنی بر تنوع کیفی در صفات فنوتیپی در اثر القا جهش درون شیشه ای یا مواد جهش زا مشابهت دارد. Jain و همکاران (۱۹۸۹) کاهش رشد و گلدهی خردل هندی، Guadagnini (۲۰۰۰) کوتولگی، وجود برگ های شمشیری و چروکیده تنباکو و Nehnevajova و همکاران (۲۰۰۷) تغییر در رنگ و شکل برگ در خردل هندی در واریته های درون شیشه ای را مشاهده نمودند.تنوع مورفولوژیکی در میان گیاهان حاصل از باززایی کالوس ها نسبت به شاهد در این آزمایش نشان دهنده وقوع تنوع سوماکلونال در طی عملیات کشت بافت می باشد که توسط سایر پژوهشگران نیز با ارزیابی های فنوتیپی در گیاهانی مانند بگونیا و پاپایا ثابت شده است (&Kuijpers, 1994; Homhuan et al., 2008 Bouman,). القا EMS بر روی بذر اگرچه تنوع متفاوتی را در برخی صفات مورفولوژیکی نسبت به شاهد

[1] . Concentration
[2] . Uptake (Extraction)

ایجاد نمود اما در افزایش توان جذب سرب اثری نداشت. اما گیاهان مقاوم به سرب حاصل از مسیرهای کشت درون شیشه ای دچار تغییرات گسترده تری از جمله افزایش در میزان تجمع و غلظت سرب در اندام های هوایی شدند. به منظور بررسی چگونگی تنوع پالایندگی در واریته های جدید، میزان جذب سرب و زیست توده اندام هوایی گیاهان تیمار شده نسبت به شاهد (۱۰۰ درصد) مقایسه گردید. میزان جذب برموداگرس علاوه بر اینکه تحت تاثیر میزان غلظت تجمع یافته سرب از محیط در اندام های هوایی بود، میزان ماده خشک یا زیست توده تولید شده توسط گیاهان نیز صفت جذب را تحت تاثیر قرار داد. در بین گیاهان مقاوم به سرب، واریته درون شیشه ای Org5 در حدود ۲/۴ برابر زیست توده و ۱/۵ برابر جذب سرب بیشتر نسبت به شاهد داشت. بیشترین جذب سرب در واریته سوماکلونال Org2 مشاهده شد که نسبت به شاهد جذب سرب در حدود دو برابر افزایش یافته بود. در مقابل واریته درون شیشه ای Ems1 با اینکه در حدود ۲/۳ برابر زیست توده بیشتر نسبت به شاهد تولید کرده بود اما میزان جذب سرب در اندام هوایی به میزان ۵۵ درصد در این گیاه نسبت به شاهد کاهش پیدا نمود. بنابراین افزایش زیست توده الزاما موجب افزایش تجمع و جذب سرب در برموداگرس نمی باشد. این نتایج بیانگر آن است که مسیرهای مختلف القایی همیشه باعث افزایش جذب نمی گردد و گاهی گیاهان ایجاد شده بگونه ای تغییر می یابند که حتی از تجمع و جذب فلز در اندام ها اجتناب می کنند. تفاوت رفتار گیاهان در برابر حضور فلزات سمی در محیط کشت درون شیشه ای توسط سایر نویسنده ها در کلون های اینبرد و وجود فنوتیپ های متفاوت در واریته های سوماکلونال مقاوم به فلزات در گیاهانی مانند سپیدار، تنباکو و خردل هندی نیز به اثبات رسیده است که با یافته های این آزمایش مطابقت دارند. Nehnevajova و همکاران (۲۰۰۷) در طی مطالعات خود بر روی خردل هندی ذکر نمود که علاوه بر ایجاد واریته های سوماکلونال درون شیشه ای که افزایش جذب سرب را داشتند، گیاهانی با کاهش جذب سرب نسبت به شاهد نیز مشاهده شد.به منظور ارزیابی تفاوت در پروفایل ژنتیکی گیاهان مقاوم به سرب حاصل از مسیرهای القایی مختلف، الگوی باندی آنها بر اساس داده های صفر و یک در تمامی آغازگرهای RAPD به اشکال مختلف مقایسه شد. بر اساس ارزیابی گیاهان حاصل از مسیرهای مختلف القایی و مقایسه صفات غلظت و جذب سرب، چهار واریته متمایز برموداگرس از نظر کمترین جاذب و تجمع کننده سرب (Ems1)، بیشترین جاذب سرب (Org2)و بیشترین تجمع کننده سرب (Emb2) در اندام های هوایی نسبت به گیاه مادری شناسایی شد. در گیاهان گزینش شده به سرب واریته Org2 علاوه بر تولید زیست توده بیشتر نسبت به شاهد، بیشترین جذب را در بین گیاهان داشت. مقایسه الگوی باندهای چند شکل در واریته Org2 با سایر افراد وجود شش باند متمایز BB08-450، BB08-1600، BB08-2100، BB07-350، OPN14-100 و OPN14-700 را نشان داد که در این واریته تکثیر شده بودند ولی در سایر افراد حضور نداشتند (جدول ۱). در واریته Emb2 که بیشترین تجمع سرب را در اندام هوایی داشت نیز دو باند متمایز BB08-2100 و OPG11-50 نیز شناسایی شد که در سایر افراد این باندها تکثیر نشده بود (جدول ۲).

بر اساس نتایج حاصل از مقایسه الگوی باندهای چند شکل در بین واریته سوماکلونال جاذب[1](Org2) و تجمع کننده[2] سرب (Emb2) در برموداگرس مشاهده می شود که باند اختصاصی BB08-2100 bpبطور مشترک در هر دو گیاه با استفاده از نشانگر RAPD تکثیر شد و در سایر گیاهان حضور آن مشاهده نشد. با توجه به اینکه این واریته ها در جهت افزایش صفات مربوط به پالایندگی سرب جهش یافته بودند می توان نتیجه گیری کرد که به احتمال زیاد باند BB08-2100 bp مرتبط با مکان ژنومی کد کننده صفت توانایی تجمع کنندگی سرب در برموداگرس می باشد و با این تفسیر احتمال تغییر ژنتیکی در این گیاه را در جهت افزایش تجمع سرب اثبات می نماید. در طی آزمایشی مشاهده شد گیاهان باززایی شده از سلول های سوسپانسیونی مقاوم به گلایفوست در نیشکر شش برابر مقاومت بیشتر به این علف کش نسبت به گیاهان حساس نشان دادند. در الگوی باندی RAPD نیز در گیاهان باززایی شده مقاوم، یک باند ویژه با اندازه bp564 مشاهده شد که در گیاهان حساس این باند تکثیر نشده بود (Zambrano, et al., 2003). بنابراین غربالگری درون شیشه ای برموداگرس ابزار مناسبی برای گزینش و ایجاد لاین های اصلاح شده برای مقاومت به سرب بود. بر اساس نتایج

[1] . Extractor plant
[2] . Accumulator plant

بدست آمده می توان اظهار کرد صفت مقاومت به سرب در برمودا‌گرس با توانایی تجمع سرب ارتباطی ندارد. بنابر تعاریف مورد قبول در تکنیک های گیاه پالایی واریته های درون شیشه ای Org2، Org5 و Emb2می توانند به عنوان گزینه های مناسب برای پالایندگی مناطق آلوده به سرب مورد استفاده قرار گیرند.

جدول ۱- مقایسه وضعیت باندهای چند شکل در واریته Org2 با افراد مختلف حاصل مسیرهای القایی به همراه شاهد

آغازگر	افراد مورد مقایسه		R^2
	Org2	سایر افراد	
BB08-2100	+	−	۰/۸۴
BB08-1600	+	−	۰/۸۹
BB08-450	+	−	۰/۸۹
BB07-350	+	−	۰/۸۴
OPN14-700	+	−	۰/۸۴
OPN14-100	+	−	۰/۹۴

جدول ۲- مقایسه وضعیت باندهای چند شکل در واریته Emb2 با سایر افراد حاصل مسیرهای القایی به همراه شاهد

آغازگر	افراد مورد مقایسه		R^2
	Emb2	سایر افراد	
BB08-2100	+	-	۰/۸۴
OPG11-50	+	-	۰/۸۴

References

Alibert G., Aslane-Chanab´e C. &Burrus M. 1994.Sunflower tissue and cell cultures and their use in biotechnology. Plant PhysiolBiochem. 32: 31–44.

Alloway B. J.1990. Heavy metals in soils.John Wiley and Sons, Inc. New York, ISBN 0470215984.

Al-Zahim M., Ford-Lloyd B. & Newbury H. 1999. Detection of somaclonal variation in garlic (*Alliumsativum*L.) using RAPD and cytological analysis. Plant Cell Reports. 18: 473-477.

Bajji M., Lutts S. &Kinet J. M: Physiological changes after exposure to and recovery from polyethylene glycol-induced water deficit in callus culture issued from durum wheat (*Triticum durum*) cultivars differing in drought resistance. J. 2000. Plant Physiol. 156: 75–83.

Bouman H. &KuijpersAM. 1994. RAPD-patterns and somaclonal variation in Begonia. In: Abstr 4th IntCongr Plant Mol Biol., Amsterdam, poster 37.

Gatti E. 2008.Micropropagation of Ailanthus altissima and *in vitro* heavy metal tolerance.Biologiaplantarum. 52 (1): 146-148.

Guadagnini M. 2000.In vitro-breeding for metal accumulation in two tobacco (Nicotianatabacum) cultivars.Thesis no. 1288, University Freiburg, Switzerland. 99.

Homhuan S., Kijwijan B.,Wangsomnuk P. &Bodhipadma K. 2008. Variation of plants derived from indirect somatic embryogenesis in cotyledon explants of papaya. Science Asia.: 34: 347-352.

Jain RK, Sharma DR, Chowdhury JB.1989. High frequency regeneration and heritable somaclonal variation in *Brassica juncea*. Euphytica 40:75–81

Khawale R.A., Yerramilli V. & Singh S.K. 2007.Molecular marker-assisted selection of in vitro chemical mutagen-induced grapevine mutants.Current Science. 92: 1056–1060.

Latado R.R., Adames A.H. &Neto A.T. 2004.*In vitro* mutation of chrysanthemum (*Dendranthemagrandiflora*Tzvelev) with ethylmethanesulphonate (EMS) in immature floral pedicels. Plant Cell, Tiss. Org. Cult.: 77: 103–106.

McGrath S.P. & Zhao F.J. 2003.Phytoextraction of metals and metalloids from contaminated soils.Current Opinion in Biotechnology. 14: 277-282.

Nehnevajova E., Herzig R., Erismann KH. &Schwitzguébel JP.2007. In vitro breeding of *Brassica juncea* L. to enhance metal accumulation and extraction properties. Plant Cell Rep. 26(4): 429-37.

Skirvin R.M., McPheeters K.D. & Norton M. 1994.Sources and frequency of somaclonal variation.Horticulture Science. 29: 1232-1237.

Tewary PK., Sharma A., Raghunath MK. &Sarkar A: *In vitro* response of promising mulberry (*Morus*sp.) genotypes for tolerance to salt and osmotic stresses. Plant Grow. Regul. 2000: 30: 17-21.

Zambrano A.Y., Demey J.R. & Gonzalez V. 2003.*In Vitro* Selection of a Glyphosate-Tolerant Sugarcane Cellular Line.Plant Molecular Biology Reporter. 21: 365–373.

Evaluation ofmutantplantswith afocus on improving thelead phytoremediation in bermudagrass

M. Taghizadeh[1*], M. Kafi[2], M. Ftahi Moghadam[2]

1- Dept. of horticultural science, Arak University, Arak, Iran 2- Dept. of horticultural science, Tehran University, karaj, Iran

Abstract

Recently hyperaccumulator plants for heavy metals are a chose of interest for remediating pollutant areas. The aims of this research were to evaluate the tolerance and Pb accumulating of bermudagrass, used induced variation and molecular tracing in regerated plants. In this study, plants derived from in vitro cultures, seeds with/without EMS treated paths were screen in present of Pb and exposed to Pb. Some screened plants showed an enhanced accumulation of Pb, some an enhanced exclusion, whereas other variants did not show any changed Pb accumulation properties. The result showed that new variaties derived in vitro selection have more Pb accumulation than those derived EMS treatment. The RAPD banding patterns revealed a BB08-2100 band in Pb extractor and accumulator plant that can be used to characterize the tolerant hyperaccumulators. The improvement of Pb accumulation in Pb accumulator and extraction varieties indicated a successful selection bermudagrass for breeding traits such as phytoremediation purpose.

Keywords: Turfgrass- Phytoremediation- Somaclonal variation- RAPD