اثر اتیل‌متان‌سولفونات (EMS) بر برخی از شاخص‌های رشد و نمو در گیاهان باززائی‌شده اطلسی (*Petunia hybrida* Vilm.)

The Effect of Ethyl Methane Sulfonate on Some of Growth and Developmental Parameters in Plants Regenerated Petunia (*Petunia hybrida* Vilm.)

ندا السادات سهی[۱] و علی‌اکبر احسانپور[۲*]

تاریخ دریافت: ۹۲/۰۷/۲۸ تاریخ پذیرش: ۹۲/۱۲/۱۷

چکیده

به‌منظور بررسی اثر EMS بر برخی از شاخص‌های رشدونمو در نمونه‌های باززائی‌شده گیاه اطلسی (*Petunia hybrida* Vilm.)، ابتدا بذر این گیاه در شیشه‌های حاوی محیط‌کشت (MS) کشت داده شد. سپس از یک گیاه به‌تعداد زیاد واکشت‌های متعددی تکثیر شد. جداکشت‌هایی از قطعات برگ و ساقه آن تهیه و تحت تیمار EMS با غلظت ۰/۱٪ و ۰/۲٪ به‌مدت ۱۵، ۳۰ و ۶۰ دقیقه قرار گرفته و به محیط کشت باززائی (MS حاوی سیتوکینین Benzyl Amino Purine (BAP) انتقال یافتند. در نهایت گیاهچه‌های باززائی شده از لحاظ مقدار رنگیزه‌های فتوسنتزی، قطر سیستم آوندی و ریشه‌دهی مورد بررسی قرار گرفتند. همچنین پروتئین گیاهچه‌ها استخراج و مقدار پروتئین کل و الگوی الکتروفورزی آن‌ها ارزیابی شد. نتایج نشان داد گیاهانی که تحت تیمار با مدت زمان و غلظت بیشتری از EMS قرار گرفتند تغییرات قابل‌توجهی از لحاظ مقدار رنگیزه‌های فتوسنتزی، قطر سیستم آوندی و زمان ریشه‌دهی نسبت به گیاهان شاهد و بقیه گیاهان تیمار شده نشان دادند. این تغییرات با تغییرات حاصل از اندازه‌گیری پروتئین کل و الگوی الکتروفورزی پروتئینی آن‌ها نیز مطابق بود. به هرحال غلظت و مدت زمانی از تیمار EMS که منجر به تغییر در گیاه می‌شود برای هر گیاه متفاوت است و بستگی به گیاه مورد مطالعه دارد.

واژه‌های کلیدی: اطلسی، اتیل‌متان‌سولفونات، کلروفیل، پروتئین

۱. دانش‌آموخته کارشناسی‌ارشد فیزیولوژی گیاهی، دانشکده علوم، دانشگاه اصفهان، اصفهان

۲. استاد گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه اصفهان، اصفهان

*: نویسنده مسوول Email: ehsanpou@sci.ui.ac.ir

این مقاله از پایان‌نامه کارشناسی‌ارشد نویسنده اول استخراج گردیده است.

مقدمه

گیاه اطلسی از جنس *Petunia* Juss.، اولین بار توسط جوسیو (Jussieu) در ۱۸۰۳ معرفی شد، این جنس متعلق به خانواده Solanaceae و دارای حدود ۳۰ گونه است *گراتز و واندن بوش* (Gerats and Vandenbussche, 2005). *Petunia hybrida* Vilm. که همان اطلسی شناخته شده است یک گونه گیاهی زینتی مهم از لحاظ اقتصادی است که رنگ‌های مختلف دارد *ابوقائد* و همکاران (Abu-Qaoud *et al*., 2010) و از لحاظ تجاری به‌عنوان یک گیاه خوش‌بو *ناکامورا* و همکاران (Nakamura *et al*., 2006) و زینتی گراتز و واندن بوش (Gerats and Vandenbussche, 2005) باارزش است. به‌همین دلیل تغییرات رشد و نموی در جهت افزایش کیفیت از قبیل رنگ گل، طول عمر و شکل گیاه اهداف اقتصادی مهمی هستند. فاکتورهای محیطی مختلفی بر ریخت‌زایی گیاه اطلسی در شرایط کشت *In Vitro* یافت شده است. به‌عنوان مثال تغییرات آناتومیکی در اثر تغییرات نیتروژن، کلسیم و اتیلن محیط‌کشت بر باززائی ساقه و ریشه در گیاه اطلسی انجام شده است. همچنین مطالعات مختلفی در کشت *In Vitro* گیاه *Petunia hybrida* انجام شده و خصوصیاتی از قبیل شکل برگ، رنگ و شکل گل ارزیابی شده است. نتایج اثبات کرده که فنوتیپ‌های جدیدی از این گیاه می‌تواند از طریق اصلاح توسط کشت‌بافت ایجاد شود که ازجمله آن تغییرات شکل برگ از حالت بیضی به حالت کروی و حالت افتاده و نیز تغییرات گل و ایجاد رنگ‌های جدید و تغییر تعداد ساقه‌های تولید شده در گیاه تحت تیمار با Benzyladenine (BA) بوده است. القاء تغییرات ژنتیکی و اپی‌ژنتیکی یک روش مهم مورد استفاده برای پرورش محصولات مهم در جهت ایجاد ویژگی‌های مفید و یا حذف ژن‌های نامطلوب از گیاهان است *جابین و بوشرا* (Jabeen and Bushra, 2002). در واقع ایجاد این نوع تغییرات می‌تواند برای تغییر ویژگی‌های فیزیولوژیکی و ژنتیکی گیاه مورداستفاده قرار گیرد *ابوقائد* و همکاران (2010). این تغییرات به‌وسیله مواد رادیواکتیو یا موتاژن‌های شیمیایی ایجاد می‌شود، از جمله مهم‌ترین این مواد شیمیایی EMS است *جابین و بوشرا* (2002). از آنجایی‌که موتاسیون و یا تغییرات حاصل از تنوع سوماتیکی در جریان کشت‌بافت می‌تواند برای ویژگی‌های زینتی گیاه استفاده شود، انجام تغییرات فوق در مورد گیاه اطلسی نیز وابسته به توسعه تکنولوژی‌هایی ازجمله کشت بافت است *ابوقائد* و همکاران (2010).

اتیل‌متان‌سولفونات، اتیل‌استری از متان‌سولفونیک‌اسید با نام IUPAC 1-Methylsulfonyloxyethane است که به‌عنوان یک موتاژن، تراتوژن و کارسینوژن شناخته شده است و به‌صورت تصادفی در ترکیب ژنتیکی موجودات جهش‌هایی را اغلب به‌صورت نقطه‌ای به‌وسیله جایگزینی نوکلئوتیدها به‌ویژه گوانین و ایجاد O-6 ethylguanine با فراوانی ۵×۱۰^{-۴} - ۵×۱۰^{-۲} ایجاد می‌نماید. در گیاهان، اغلب باعث تغییرات شیمیایی در نوکلئوتیدها *سالیناس و انچس سارنو* (Salinas and Anchez-Serrano, 2006)، با تغییر در اکسیژن نوکلئوتیدها و گروه‌های فسفات DNA و نیز باعث شکست دو رشته DNA در ارگانیسم‌های عالی و موجب جفت شدن اشتباه بازها و جایگزینی جفت C/G با A/T *لاریک و الساحیل* (Larik and Al-Saheal, 1987) و موتاسیون‌های نقطه‌ای یا آسیب و حذف کروموزومی می‌شود *جابین و بوشرا* (2002). همچنین در شناخت نقش واحدهای آمینواسیدی کمک می‌کند و اطلاعات مفیدی از عملکرد ژن‌های ضروری با تولید آلل‌های غیرکشنده ضعیف می‌دهد *سالیناس و انچس سارنو* (2006) و در افزایش تنوع آللی در گیاهان و ایجاد لاین‌های پرورشی استفاده می‌شود *لاریک و الساحیل* (Larik and Al-Saheal, 1987) اتیل‌متان‌سولفونات ازجمله موادی است که باعث جهش و تغییرات فیزیولوژیکی و رشدونموی می‌شود، فراوانی این تغییرات به‌وسیله غلظت متفاوت این ماده تنظیم می‌شود *برنسکات* (Berenschot, 2008). با توجه به اینکه گیاه اطلسی از یک سو به‌عنوان یک گیاه مدل شناخته می‌شود و از طرف دیگر دارای اهمیت اقتصادی نیز هست بنابراین در این مطالعه هدف بررسی اثر EMS از نظر فیزیولوژیکی بر این گیاه است. این اطلاعات می‌تواند زمینه‌ی بررسی تغییرات ژنتیکی احتمالی را فراهم آورد.

مواد و روش‌ها

ابتدا بذرهای گیاه اطلسی تهیه شده از شرکت پاکان بذر با استفاده از الکل ۷۰ درصد (به‌مدت ۲ دقیقه) و هیپوکلریدسدیم ۲۰ درصد (به‌مدت ۲۰ دقیقه) کاملاً ضدعفونی و استریل‌شده و بر روی کاغذ صافی خشک شدند. سپس درون شیشه‌های حاوی محیط‌کشت MS *موراشیگ و اسکوگ* (Murashige and Skoog, 1962) کشت شدند. شیشه کشت شده در اتاق رشد با فتوپریود ۱۶ ساعت نور و ۸ ساعت تاریکی (شدت نور معادل ۵۰ میکرومول فوتون بر سانتی‌متر مربع بر ثانیه) با دمای ۲۵°C قرار داده شدند. بذرها در محیط‌کشت جوانه‌زده و رشد نمودند و پس از یک هفته به مرحله چندبرگی رسیدند. از قطعات ساقه به‌همراه یک جوانه جانبی به‌منظور واکشت گیاهان و تکثیر هر ۳-۴ هفته یک‌بار در محیط‌کشت قبلی انجام شد. گیاهان

حاصل از تکثیر در شیشه، در شرایط استریل از شیشه خارج و از قطعات ساقه با اندازه ۵ میلیمتر و برگ تا ۸ میلیمتر مربع بریده شدند. قطعات برگ و ساقه برش داده شده در EMS با غلظت ۱٪ و ۲٪ به‌مدت ۱۵، ۳۰ و۶۰ دقیقه قرار داده شدند و پس از شستشو با آب مقطر استریل به شیشه‌های حاوی محیط کشت باززائی (MS + ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP – بنزیل‌آمینوپورین) انتقال یافتند، سپس شیشه‌ها به اتاق کشت منتقل شدند. پس از ۲ هفته از لبه‌های جداکشت‌های برگ کالوس به‌همراه جوانه نوساقه کوچک تولید شد. نوساقه‌های ایجاد شده به‌تدریج به یک گیاه کامل اطلسی تبدیل شدند و در نهایت پس از چند هفته این نوساقه‌ها به محیط‌کشت MS انتقال یافتند. به‌منظور حذف تفاوت ژنتیکی سلول‌های باززائی‌شده برای آنالیزهای بیوشیمایی و مولکولی تنها یک گیاه باززائی شده به‌طور تصادفی انتخاب و با تکثیر آن آنالیزهای بعدی روی آنها انجام شد.

پس از ۸ هفته استخراج رنگیزه‌های فتوسنتزی با استفاده از استون ۸۰ درصد در تاریکی از نمونه‌های گیاهی روی یخ انجام شد. پس از صاف‌کردن توسط کاغذ صافی واتمن شماره‌ی یک، جذب محلول نهایی با استفاده از دستگاه اسپکتوفتومتری در طول موج ۶۶۳، ۶۴۵ و ۴۷۰ نانومتر به‌ترتیب برای کلروفیل a، کلروفیل b و کاروتنوئید قرائت گردید. سپس مقدار هریک از رنگیزه‌ها و مقدار کلروفیل کل با استفاده از فرمول‌های زیر محاسبه گردید.

$$Chla\ (mg/g) = [12.7\ (D663) - 2.69\ (D645)\ ] \times V/1000 \times W$$

$$Chlb\ (mg/g) = [22.9\ (D645) - 4.68\ (D663)] \times V/1000 \times W$$

$$Total\ Chla + b\ (mg/g) = [20.2\ (D645) + 8.02\ (D663)] \times V/1000 \times W$$

$$Carotenoid = [1000\ (D470) - 1.8\ (Chla) + 85.02\ (Chlb)] / 198$$

D= جذب نوری، V= حجم نهایی عصاره، W= وزن بافت (گرم)

پس از ۸ هفته، از ساقه گیاهان شاهد، شاهد باززائی‌شده و گیاهان باززائی‌شده از ریزنمونه‌های گیاهان مادری تیمار شده با EMS با غلظت‌های ۱٪ و ۲٪ برش‌های نازکی تهیه شد و توسط میکروسکوپ نوری قطر سیستم آوندی ساقه اندازه‌گیری شد. از گیاهان شاهد و باززائی شده اطلسی به‌طور هم‌زمان واکشت‌هایی به محیط MS در اتاق کشت انتقال یافتند و هر روز از لحاظ ریشه‌دهی بررسی شدند.

اندازه‌گیری پروتئین کل طبق روش *برادفورد* (1976) با اندکی تغییر *اولسن و مشرام* (Olson and Meshram, 2007) انجام شد. تهیه محلول استوک برادفورد براساس روش *بولاق و ادلستین* (Bollag and Edelstein, 1991) انجام گرفت. همچنین بافر کار برادفورد تهیه شد (*بولاق و ادلستین*، 1991).

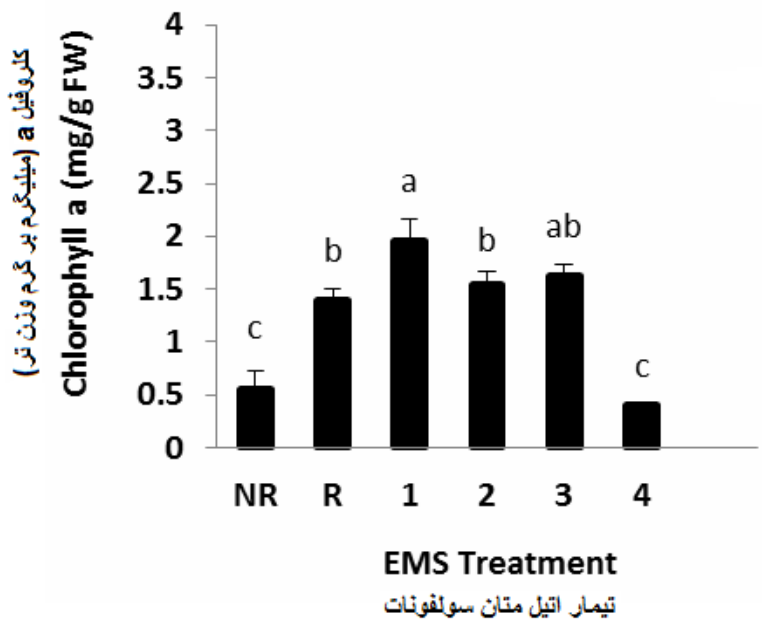
برای رسم منحنی استاندارد پروتئین از پروتئین استاندارد BSA (آلبومین سرم گاوی) با وزن مولکولی ۶۶/۲ KDa استفاده گردید. جذب هر نمونه پروتئینی حاوی پروتئین استاندارد BSA یا پروتئین مجهول پس از گذشت ۵ دقیقه از اتمام آماده‌سازی در درجه‌ی حرارت اتاق در طول موج ۵۹۵nm با دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد. این آزمایش برای هر نمونه پروتئینی استاندارد برادفورد و به‌دست آوردن غلظت نمونه‌های مجهول استفاده شد و میزان پروتئین کل محلول بر حسب mg/g FW گزارش گردید. استخراج پروتئین از ساقه و برگ گیاهان اطلسی شاهد و تیمار شده با EMS که در محیط-کشت MS رشد کرده بودند براساس روش توضیح داده شده توسط *امینی* و همکاران (2007) با کمی اصلاحات انجام گرفت. برای تهیه عصاره پروتئینی، نمونه‌ی موردنظر در هاون روی یخ کاملاً سائیده شد و به‌نسبت ۱:۳ به آن‌ها بافر استخراج اضافه گردید. سپس همگنای حاصل در در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در دور ۱۰۰۰۰rpm دو مرتبه و هر بار ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ کرده و روشناور نمونه‌ها در دمای ۷۰°C- نگهداری و برای اندازه‌گیری کمی پروتئین‌ها استفاده گردید.

به‌منظور انجام الکتروفورز پروتئین‌ها ژل جداکننده با غلظت ۱۲/۵٪ و ژل متراکم‌کننده با غلظت ۵٪ تهیه شد. ژل الکتروفورز به‌صورت عمودی با شرایط دناتوره‌کننده غیرپیوسته انجام گرفت. ژل الکتروفورز پروتئین با ابعاد ۱۰ سانتیمترمربع و ضخامت ۰/۸ میلی‌متر ساخته شد. برای بارگذاری ابتدا یکسان‌سازی غلظت پروتئینی عصاره‌ها صورت گرفت و تحت میدان الکتریکی با ولتاژ ۱۰۰ ولت و شدت جریان ۴۰ میلی‌آمپر به‌مدت ۴-۳ ساعت، الکتروفورز انجام گرفت. در نهایت باندهای پروتئینی ژل با رنگ‌آمیزی کوماسی‌بلو آشکارسازی شد. در نهایت باندهای پروتئینی با استفاده از برنامه ImageJ ابتدا به-صورت Invert درآمده و شدت نسبی آن‌ها محاسبه شد. داده-های به‌دست آمده در برنامه Excel به‌صورت ستون رسم گردید.

نتایج

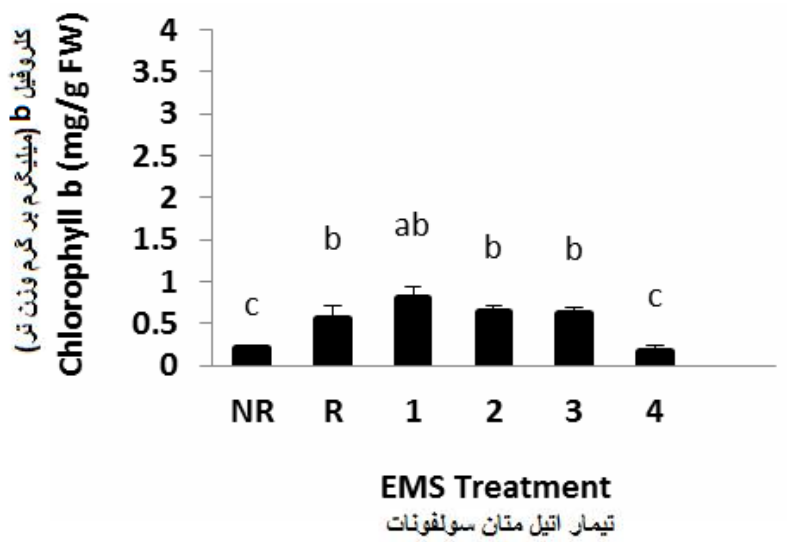
اندازه‌گیری کلروفیل a در گیاهان شاهد و تیمار شده با غلظت و مدت زمان مختلف EMS، در گیاهان شاهد و گیاهان تیمار شده با EMS با غلظت ۲٪ به‌مدت ۱۵ دقیقه عدم‌افزایش را نشان داد که در مقایسه با بقیه گیاهان معنی‌دار بود (شکل ۱). کلروفیل a در گیاهان تیمارشده با EMS با غلظت ۱٪ به‌مدت ۱۵ دقیقه بیشترین مقدار را نشان داد که این مقدار در مقایسه

با بقیه گیاهان به‌جز گیاهان تیمارشده با EMS با غلظت ۱٪ به‌مدت ۶۰ دقیقه تفاوت معنی‌داری را نشان داد، تفاوت در مقدار کلروفیل a در گیاهان شاهد باززائی‌شده، گیاهان تیمارشده با EMS با غلظت ۱٪ به‌مدت ۳۰ و ۶۰ دقیقه معنی-دار نبود اما این تفاوت در مقایسه با گیاهان دیگر معنی‌دار بود. در مورد کلروفیل b در گیاهان شاهد باززائی‌شده و گیاهان تیمارشده با غلظت ۱٪ EMS به‌مدت ۱۵، ۳۰ و ۶۰ دقیقه افزایش مقدار کلروفیل مشاهده شد که تفاوت معنی‌داری با گیاهان شاهد و گیاهان تیمار شده با غلظت ۲٪ EMS به‌مدت ۱۵ دقیقه نشان داد، اما تفاوت بین گیاهان شاهد و گیاهان تیمار شده با غلظت ۲٪ EMS به‌مدت ۱۵ دقیقه معنی‌دار نبود (شکل ۲). در روند تغییرات کلروفیل کل نیز عدم‌افزایش در گیاهان شاهد و گیاهان تیمار شده به‌مدت ۱۵ دقیقه با EMS ۲٪ وجود داشت که تفاوت معنی‌داری را بین این گیاهان با بقیه گیاهان تیمارشده نشان داد. گیاهان تیمارشده با EMS با غلظت ۱٪ به‌مدت ۱۵ دقیقه واجد بیشترین مقدار کلروفیل کل بودند اما این مقدار تفاوت معنی‌داری با گیاهان تیمار شده با EMS با غلظت ۱٪ به‌مدت ۳۰ و ۶۰ دقیقه نداشت (شکل ۳).



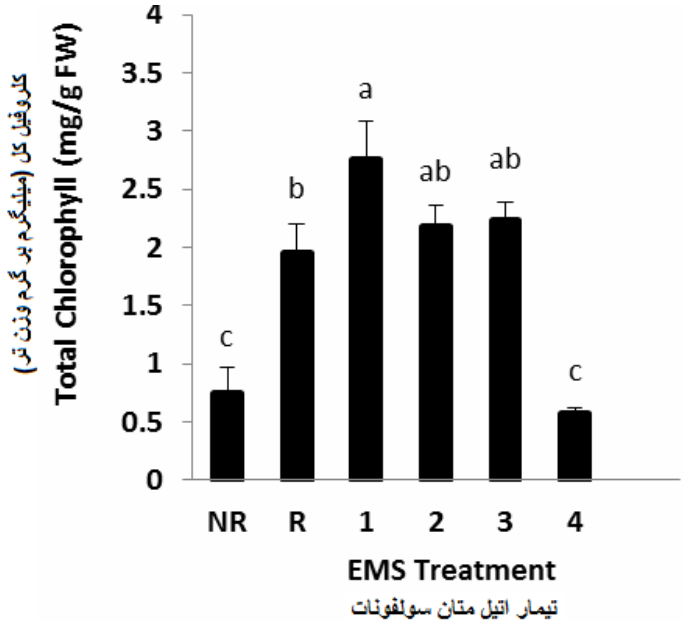
شکل ۱: اثر غلظت و زمان تیمار EMS بر میزان کلروفیل a. NR: شاهد غیرباززائی‌شده، R: شاهد باززائی‌شده، ۱: تیمار ۱۵ دقیقه EMS ۱٪، ۲: تیمار ۳۰ دقیقه EMS ۱٪، ۳: تیمار ۶۰ دقیقه EMS ۱٪، ۴: تیمار ۱۵ دقیقه EMS ۲٪. داده‌ها میانگین سه تکرار ± SD و حروف نامشابه نشان‌دهنده‌ی اختلاف معنی‌دار ($P\leq0.05$) بر اساس تست توکی می‌باشد

Fig. 1: The effect of time and concentration of EMS treatment on chlorophyll a. NR: non regenerated control, R: regenerated control, 1: treated for 15 min with EMS 1%, 2: treated for 30 min with EMS 1%, 3: treated for 60 min with EMS 1%, 4: treated for 15 min with EMS 2%, the data the mean of three replicates ±SD and dissimilar words is indicative significant difference ($P\leq0.05$) base on the Tukey test



شکل ۲: اثر غلظت و زمان تیمار EMS بر میزان کلروفیل b. NR: شاهد غیرباززائی‌شده، R: شاهد باززائی‌شده، ۱: تیمار ۱۵ دقیقه EMS ۱٪، ۲: تیمار ۳۰ دقیقه EMS ۱٪، ۳: تیمار ۶۰ دقیقه EMS ۱٪، ۴: تیمار ۱۵ دقیقه EMS ۲٪. داده‌ها میانگین سه تکرار ± SD و حروف نامشابه نشان‌دهنده‌ی اختلاف معنی‌دار (P≤0.05) بر اساس تست توکی می‌باشد

Fig. 2: The effect of time and concentration of EMS treatment on chlorophyll b. NR: non regenerated control, R: regenerated control, 1: treated for 15 min with EMS 1%, 2: treated for 30 min with EMS 1%, 3: treated for 60 min with EMS 1%, 4: treated for 15 min with EMS 2%, the data the mean of three replicates ±SD and dissimilar words is indicative significant difference (P≤0.05) base on the Tukey test

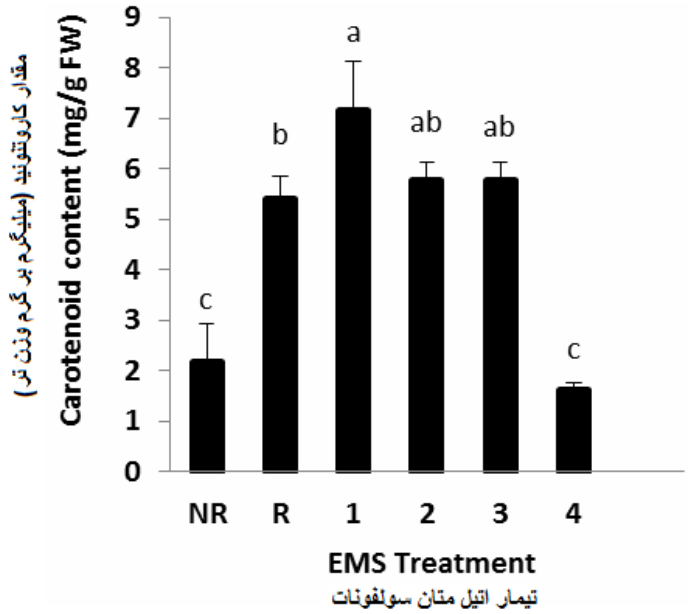


شکل ۳: اثر غلظت و زمان تیمار EMS بر میزان کلروفیل کل. NR: شاهد غیرباززائی‌شده، R: شاهد باززائی‌شده، ۱: تیمار ۱۵ دقیقه EMS ۱٪، ۲: تیمار ۳۰ دقیقه EMS ۱٪، ۳: تیمار ۶۰ دقیقه EMS ۱٪، ۴: تیمار ۱۵ دقیقه EMS ۲٪. داده‌ها میانگین سه تکرار ± SD و حروف نامشابه نشان‌دهنده‌ی اختلاف معنی‌دار (P≤0.05) بر اساس تست توکی می‌باشد

Fig. 3: The effect of time and concentration of EMS treatment on total chlorophyll. NR: non regenerated control, R: regenerated control, 1: treated for 15 min with EMS 1%, 2: treated for 30 min with EMS 1%, 3: treated for 60 min with EMS 1%, 4: treated for 15 min with EMS 2%, the data the mean of three replicates ±SD and dissimilar words is indicative significant difference (P≤0.05) base on the Tukey test

اندازه‌گیری کاروتنوئید در گیاهان شاهد باززائی‌شده و گیاهان تیمارشده با غلظت ۱٪ EMS به‌مدت ۱۵، ۳۰ و ۶۰ دقیقه افزایش مقدار کلروفیل را نشان داد که تفاوت معنی‌داری با گیاهان شاهد و گیاهان تیمارشده با غلظت ۲٪ EMS به‌مدت

۱۵ دقیقه داشت، اما تفاوت بین گیاهان شاهد و گیاهان تیمارشده با غلظت ۲٪ EMS به‌مدت ۱۵ دقیقه معنی‌دار نبود. بیشترین مقدار کاروتنوئید در گیاهان تیمار شده با EMS با غلظت ۱٪ به‌مدت ۱۵ دقیقه مشاهده شد که این مقدار در مقایسه با گیاهان شاهد باززائی‌شده معنی‌دار بود اما در مقایسه با گیاهان تیمار شده با EMS با غلظت ۱٪ به‌مدت ۳۰ و ۶۰ دقیقه معنی‌دار نبود (شکل ۴).



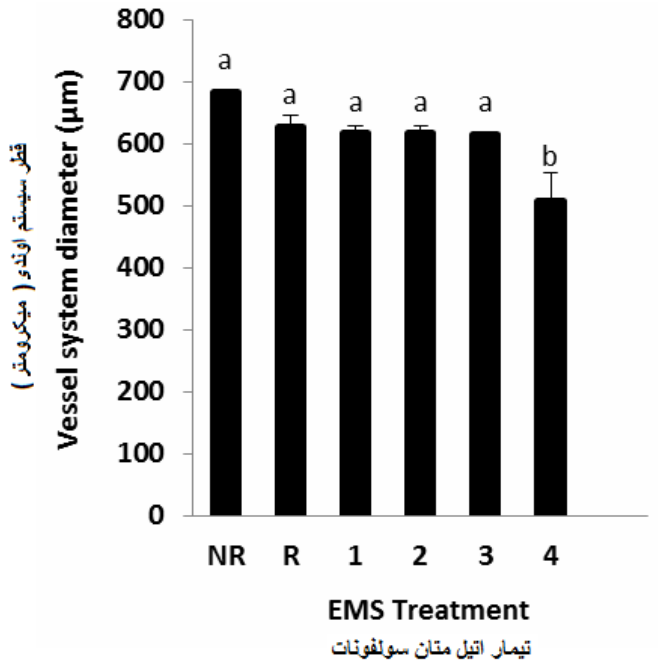
شکل ۴: اثر غلظت و زمان تیمار EMS بر میزان کاروتنوئید. NR: شاهد غیر باززائی‌شده، R: شاهد باززائی‌شده، ۱: تیمار ۱۵ دقیقه EMS ۱٪، ۲: تیمار ۳۰ دقیقه EMS ۱٪، ۳: تیمار ۶۰ دقیقه EMS ۱٪، ۴: تیمار ۱۵ دقیقه EMS ۲٪. داده‌ها میانگین سه تکرار ± SD و حروف نامشابه نشان‌دهنده‌ی اختلاف معنی‌دار ($P\leq0.05$) بر اساس تست توکی می‌باشد

Fig. 4: The effect of time and concentration of EMS treatment on carotenoid. NR: non regenerated control, R: regenerated control, 1: treated for 15 min with EMS 1%, 2: treated for 30 min with EMS 1%, 3: treated for 60 min with EMS 1%, 4: treated for 15 min with EMS 2%, the data the mean of three replicates ±SD and dissimilar words is indicative significant difference ($P\leq0.05$) base on the Tukey test

تأثیر EMS بر قطر سیستم آوندی ساقه بیانگر این بود که در گیاهانی که به‌مدت ۱۵ دقیقه در EMS با غلظت ۲٪ قرار گرفته بودند نسبت به گیاهان شاهد و گیاهانی که در زمان و غلظت-های دیگر EMS قرار گرفته بودند کاهش معنی‌دار قطر سیستم آوندی ساقه اتفاق افتاده است. درحالی‌که، تفاوت در قطر سیستم آوندی در بین گیاهان دیگر معنی‌دار نبود (شکل ۵).

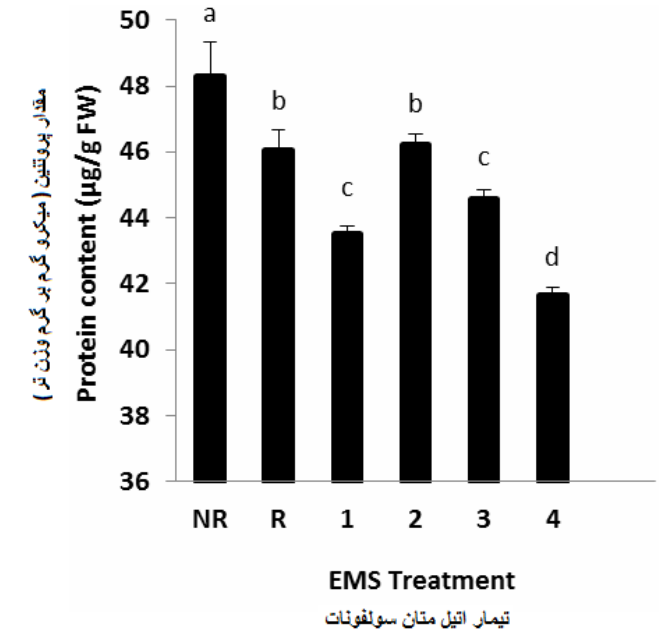
در بررسی زمان ریشه‌دهی گیاهان شاهد و باززایی شده اطلسی مشاهده شد که در گیاهان شاهد و گیاهان تیمار شده با EMS با غلظت ۲٪ به‌مدت ۱۵ دقیقه، دیرتر از گیاهان دیگر ریشه‌دهی اتفاق افتاد و این زمان در گیاهان تیمار شده با EMS با غلظت ۲٪ بیشتر از گیاهان شاهد بود. به‌طوری‌که گیاهان تیمار شده به مدت ۱۵، ۳۰ و۶۰ دقیقه با EMS با غلظت ۱٪ پس از ۳۰ روز، گیاهان شاهد پس از ۵۰ روز و گیاهان تیمار شده به‌مدت ۱۵ دقیقه با EMS با غلظت ۲٪ پس از ۶۰ روز و گاهی بیشتر ریشه‌دار شدند.

اندازه‌گیری پروتئین‌های برگ نشان داد که بیشترین مقدار پروتئین متعلق به گیاهان شاهد و کمترین مقدار متعلق به گیاهان تیمار شده با EMS با غلظت ۲٪ به‌مدت ۱۵ دقیقه است. اما به‌طورکلی کاهش معنی‌دار مقدار پروتئین در همه تیمارها نسبت به گیاهان شاهد مشاهده شد (شکل ۶).



شکل ۵: اثر غلظت و زمان تیمار EMS برقطر سیستم آوندی ساقه. NR: شاهد غیربازززائی‌شده، R: شاهد باززائی‌شده، ۱: تیمار ۱۵ دقیقه EMS ۱٪، ۲: تیمار ۳۰ دقیقه EMS ۱٪، ۳: تیمار ۶۰ دقیقه EMS ۱٪، ۴: تیمار ۱۵ دقیقه EMS ۲٪. داده‌ها میانگین سه تکرار ± SD و حروف نامشابه نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار (P≤0.05) بر اساس تست توکی می‌باشد

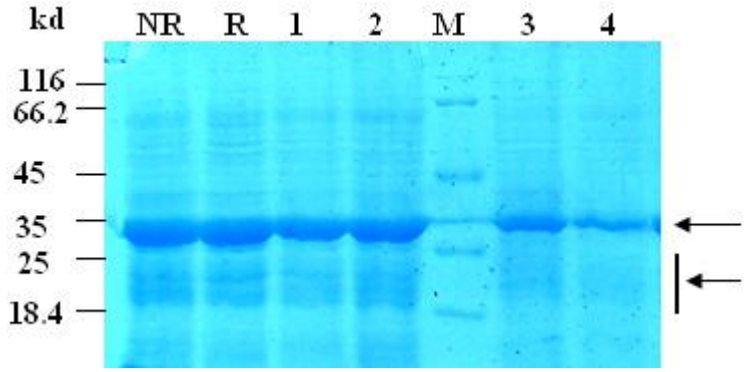
Fig. 5: The effect of time and concentration of EMS treatment on diameter vascular system. NR: non regenerated control, R: regenerated control, 1: treated for 15 min with EMS 1%, 2: treated for 30 min with EMS 1%, 3: treated for 60 min with EMS 1%, 4: treated for 15 min with EMS 2%, the data the mean of three replicates ±SD and dissimilar words is indicative significant difference (P≤0.05) base on the Tukey test



شکل ۶: اثر غلظت و زمان تیمار EMS بر پروتئین محلول. NR: شاهد غیربازززائی‌شده، R: شاهد باززائی‌شده، ۱: تیمار ۱۵ دقیقه EMS ۱٪، 22: تیمار ۳۰ دقیقه EMS ۱٪، ۳: تیمار ۶۰ دقیقه EMS ۱٪، ۴: تیمار ۱۵ دقیقه EMS ۲٪. داده‌ها میانگین سه تکرار ± SD و حروف نامشابه نشان‌دهنده‌ی اختلاف معنی‌دار (P≤0.05) براساس تست توکی می‌باشد

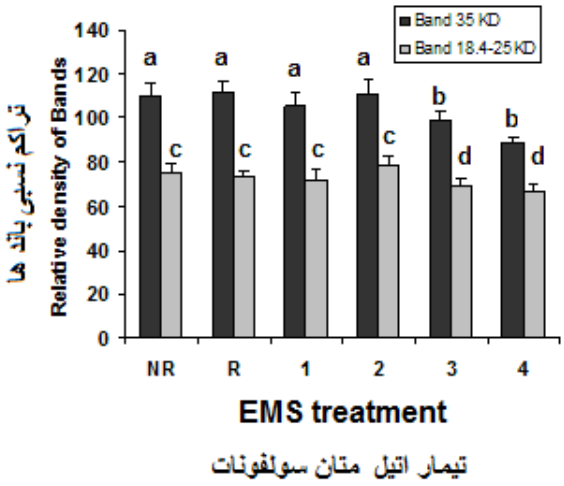
Fig. 6: The effect of time and concentration of EMS treatment on total protein. NR: non regenerated control, R: regenerated control, 1: treated for 15 min with EMS 1%, 2: treated for 30 min with EMS 1%, 3: treated for 60 min with EMS 1%, 4: treated for 15 min with EMS 2%, the data are mean of three replicates ±SD and dissimilar words is indicative significant difference (P≤0.05)base on the Tukey test

تیمار EMS علاوه بر این‌که بر مقدار پروتئین محلول کل اثر گذاشت بر الگوی الکتروفورزی پروتئین‌های برگ نیز اثرگذار بوده است. در الگوی پروتئینی برگ ۳ باند پروتئینی شاخص مشاهده گردید که به‌طور مشخصی تغییر کرده بود. تراکم نسبی پروتئین‌ها در محدوده باندهای ۱۸/۴-۲۵ و ۳۵ کیلودالتونی نشان داد که در تمامی تیمارهای EMS مقدار پروتئین نسبت به گیاهان شاهد کاهش یافته است و کمترین مقدار پروتئین مربوط به گیاهان تیمار شده با EMS با غلظت ۲٪ به مدت ۱۵ دقیقه است (شکل ۷).



شکل ۷: الگوی الکتروفورزی (SDS-PAGE) پروتئین‌های برگ گیاهان اطلسی شاهد و تیمارشده با EMS. NR: شاهد غیربازائی‌شده، R:شاهد باززائی‌شده، ۱: تیمار ۱۵ دقیقه EMS ۱٪، ۲: تیمار ۳۰ دقیقه EMS ۱٪،۳ : تیمار ۶۰ دقیقه EMS ۱٪، ۴: تیمار ۱۵ دقیقه EMS ۲٪، M: مارکر. (محدوده باندهای تغییر یافته با علامت فلش نشان داده شده است)

Fig. 7: SDS-PAGE pattern of protein in petunia's leaf of control and treated with EMS. NR: non regenerated control, R: regenerated control, 1: treatment with EMS 1% for 15 minute, 2: treatment with EMS 1% for 30 minute, 3: treatment with EMS 1% for 60 minute, 4: treatment with EMS 2% for 15 minute, M: marker



شکل ۸: تراکم نسبی باندهای پروتئینی در محدوده ۳۵ و محدوده ۱۸.۴ تا ۲۵ کیلودالتون. NR: شاهد غیربازائی‌شده، R:شـــاهد باززائی‌شده، ۱: تیمار ۱۵ دقیقه EMS ۱٪، ۲: تیمار ۳۰ دقیقه EMS ۱٪، ۳: تیمار ۶۰ دقیقه EMS ۱٪، ۴: تیمار ۱۵ دقیقه EMS ۲٪

Fig. 8: The relative density of the protein bands in the range of 18.4 to 35 and 25 kDa NR: non regenerated control, R: regenerated control, 1: treatment with EMS 1% for 15 minute, 2: treatment with EMS 1% for 30 minute, 3: treatment with EMS 1% for 60 minute, 4: treatment with EMS 2% for 15 minute

بحث

کلروفیل نقش یگانه و اثرگذاری در زندگی گیاهان عالی دارد. میزان کلروفیل یک ویژگی اصلی و مهم برای فهم چگونگی پاسخ گیاه به تیمارهای مختلف و محیطی که در آن به‌سر می‌برد، محسوب می‌شود. فرایند فتوسنتز تحت تأثیر رنگیزه-های فتوسنتزی است که این نیز می‌تواند تحت تأثیر تنظیم-کنندگان و مواد موجود در محیط قرار گیرد *بکتا* و همکاران (Bekheta *et al*., 2008). بیوسنتز و تخریب کلروفیل فرایند پیچیده‌ای است که توسط فاکتورهای مختلفی تنظیم می‌گردد *ناکامورا* و همکاران؛ *مونامونگ* و همکاران (Nakamura *et al*., 2006 and Mwanamwenge *et al*., 1999). همان‌گونه که نتایج نشان داد، در اکثر گیاهان تیمار شده با EMS افزایش کلروفیل a، b و کلروفیل کل نسبت به گیاهان شاهد مشاهده گردید که مشابه نتایجی است که توسط *لاریک* و *السها* (Larik and Al-Sahea, 1987) در گیاهان گندم (*Triticum aestivum*) واریته Al-Samma تیمارشده با EMS به‌دست آمده، آن‌ها دریافتند که افزایش در غلظت و مدت زمان قرارگیری در EMS با غلظت ۰/۴٪ و ۰/۲٪ به‌مدت ۳ و ۷ ساعت افزایش قابل‌توجهی در کلروفیل را در مقایسه با گیاهان شاهد به‌دنبال دارد *لاریک* و *السها* (1987). همچنین این نتایج با نتایج به‌دست آمده توسط *لاریک* و همکاران (Larik *et al*, 1984) و نتایج به‌دست آمده توسط *سبا* و *میرزا* (Saba and Mirza, 2002) که افزایش مقدار کلروفیل را نشان دادند منطبق است، نتایج مشابهی نیز در فلفل *Capsicum annuum* (Patil *et al*., 1997) و یولاف *Avena sativa* *کریشنامورتی و واسودوان* (Krishna-Murthy and Vasudevan, 1984) تیمارشده با EMS گزارش شده است. نتایج حاضر نشان داد که کم‌ترین مقدار کلروفیل در گیاهان تیمارشده با EMS با غلظت ۲٪ به‌مدت ۱۵ دقیقه وجود دارد که تفاوت قابل‌توجهی را با بقیه تیمارها نشان می‌دهد. داده‌های حاضر در این رابطه مشابه نتایج به‌دست آمده توسط *اسریواستاوا* و *پاندی* (Srivastava and Pandey, 2012) است که عدم‌افزایش و حتی کاهش مقدار کلروفیل در تیمار گیاهان آفتابگردان با EMS به‌مدت ۷ ساعت را گزارش کرده‌اند و این‌گونه بیان کرده‌اند که عدم‌افزایش و یا کاهش مقدار کلروفیل می‌تواند مربوط به نقش بازدارندگی EMS در مراحل بیوسنتز کلروفیل باشد *اسریواستاوا* و *پاندی* (2012) که با بسیاری از مطالعات دیگر نیز تطابق دارد *لیچنتالر و ولبوم؛ سوتلانا* (Lichtenthaler and Welburn, 1983 و Svetlana, 2004). همچنین نتایج مشابهی توسط *لاریک* و *السها* (1987) در گیاهان گندم *Triticum aestivum* واریته Al-Samma تیمارشده با EMS با غلظت ۰/۶٪ به‌مدت ۳ ساعت و واریته Yocorojo تیمارشده با EMS با غلظت ۰/۲٪ به‌مدت ۷ ساعت گزارش شده است و می‌تواند این‌گونه توضیح داده شود که براساس ساختار ژنتیکی متفاوت گیاهان و واریته‌های مختلف تأثیر EMS و پاسخ گیاهان به آن نیز متفاوت است *لاریک* و *السها* (1987). *چون* و همکاران (Chun *et al*., 1963) بیان می‌کنند که تغییرات کلروفیل در غلظت‌های مختلف EMS می‌تواند به‌علت تغییر DNA در کلروپلاست‌ها باشد. DNA کلروپلاست در برخی از گیاهان غنی از گوانین و سیتوزین است و EMS به‌طور ترجیحی با گوانین واکنش می‌دهد *فریز* (Freese, 1963). به-همین دلیل تغییرات کلروفیل می‌تواند مربوط به تغییرات آلکیلاسیون DNA کلروپلاست باشد اما این‌که چه غلظت و مدت زمانی از تیمار EMS منجر به تغییر در میزان کلروفیل می‌شود برای هر گیاه متفاوت است و بستگی به گیاه مورد مطالعه و شرایط آزمایش دارد. به هرحال افزایش تنوعات سوماتیکی و یا ژنتیکی با استفاده از EMS می‌تواند پایه و اساسی برای به‌نژادی گیاه باشد *جابین و میرزا* (Jabeen and Mirza, 2004). نتایج حاضر نشان داد که روند تغییرات کاروتنوئید در گیاهان اطلسی شاهد و تیمارشده با EMS مشابه تغییرات کلروفیل است. این تغییرات می‌تواند به دلیل تأثیر مشابه EMS بر مسیرهای سنتزی کاروتنوئید باشد. به هرحال اظهارنظر قطعی نیاز به بررسی دقیق مسیر بیوسنتز کاروتنوئیدها در گیاه اطلسی دارد.

نتایج حاصل از اندازه‌گیری قطر سیستم آوندی با نتایج به-دست آمده در مورد بسیاری از شاخص‌های رشدونموی توسط بسیاری از محققان مطابقت دارد. ازجمله نتایج به‌دست آمده توسط *آرونا* و همکاران (Aruna *et al*., 2010) در بادمجان در اثر تأثیر EMS، بیانگر روند کاهشی بر شاخص‌هایی از قبیل تعداد انشعابات گیاه و کاهش وزن و اندازه میوه است که آن را مربوط به اثر موتاژن‌ها می‌دانند. نتایج مشابهی نیز توسط *سبا* و *میرزا* (2002) در تأثیر EMS با غلظت ۱٪ به‌مدت ۶ ساعت بر کاهش طول ریشه و ساقه، تعداد و متوسط وزن میوه در *Lycopersicon esculentum* گزارش شده شده است *صبا و میرزا* (Saba and Mirza, 2002). همچنین نتایج به‌دست آمده توسط *کومار و یاداو* (Kumar and Yadav, 2010) در تأثیر EMS با غلظت ۰/۵٪ بر گیاه کنجد نیز بیانگر کاهش رشد در تیمارهای ۵ ساعت نسبت به تیمارهای ۳ ساعت است.

یافته‌های حاضر نشان داد که در گیاهان شاهد و گیاهان تیمار شده با EMS با غلظت ۲٪ به‌مدت ۱۵ دقیقه دیرتر از

گیاهان دیگر ریشه‌دهی اتفاق می‌افتاد. با توجه به هماهنگی این نتایج با نتایج حاصل از اندازه‌گیری کلروفیل که نشان می‌دهد کم‌ترین مقدار کلروفیل در گیاهان شاهد و گیاهان تیمار شده با EMS با غلظت ۰/۲٪ به‌مدت ۱۵ دقیقه وجود دارد و نظر به این‌که در گیاهان شاهد و گیاهان تیمارشده با EMS با غلظت ۰/۲٪ به‌مدت ۱۵ دقیقه دیرتر از گیاهان دیگر ریشه‌دهی صورت گرفت می‌توان این‌گونه استنباط کرد که کلروفیل کمتر و به‌دنبال آن کاهش فتوسنتز باعث تأخیر و کاهش عملکرد سایر فرایندهای فیزیولوژیکی گیاه شده است. مشابه این نتایج مطالعات انجام شده توسط *لاریک* و *السها* (1987) وجود دارد. آنها در گیاهان تیمارشده افزایش در وزن حبوبات متعاقب افزایش مقدار کلروفیل و نیز کاهش وزن بذر به‌دنبال آن کاهش مقدار کلروفیل را مرهون افزایش و کاهش در فعالیت فتوسنتزی گیاهان می‌دانند *لاریک* و *السها* (1987) همچنین این نتایج مطابق با نتایج گزارش شده توسط *لاریک* و همکاران (1984) است. به‌طورکلی حاصل مطالعات ما نشان می‌دهد که کاهش تمامی شاخص‌های رشدونموی و فیزیولوژیکی اندازه‌گیری شده از قبیل قطر سیستم آوندی و تأخیر ریشه‌دهی گیاهان به‌دنبال آن سنتز مقدار کمتر کلروفیل در گیاهان تیمار شده با EMS با غلظت ۰/۲٪ به‌مدت ۱۵ دقیقه اتفاق افتاده است که با اظهارات *لاریک* و *السها* (1987) که بیان می‌کنند که گیاهان با نقص یا کمبود کلروفیل در برخورد با نیازهای متابولیکی خود ناتوانند و در نهایت بر کل فیزیولوژی گیاه تأثیر گذاشته و حتی آن را تخریب می‌کند *لاریک* و *السها* (1987) مطابقت دارد.

در چند سال گذشته توجه زیادی به تغییرات پروتئین‌ها در استفاده از تیمارهای مختلف به‌منظور شناسایی و فهم نقش پروتئین‌ها در تغییر صفات مختلف گیاهان و یا مقاومت به تنش‌ها صورت گرفته است. کاهش مقدار پروتئین می‌تواند در اثر کاهش میزان سنتز پروتئین‌ها، افزایش فعالیت آنزیم‌های هیدرولیزکننده پروتئین‌ها، کاهش آمینواسیدهای در دسترس و یا دناتوره‌شدن آنزیم‌های درگیر در سنتز پروتئین‌ها باشد. در بین گیاهان تیمار شده با EMS، کمترین مقدار پروتئین مربوط به گیاهان تیمارشده با EMS با غلظت ۰/۲٪ به‌مدت ۱۵ دقیقه است. نتایج مشابهی نیز در مطالعات *آرولبالاچاندران و مولاینادان* (Arulbalachandran and Mullainathan, 2009) در تأثیر غلظت‌های ۰/۱ و ۰/۱۲ درصد EMS بر نخود وجود دارد که نشان می‌دهد بیشترین مقدار پروتئین در تیمارهای ۰/۱ درصد EMS وجود دارد و مقدار پروتئین در گیاهان تیمار شده با ۰/۱۲ درصد EMS کمتر است. با توجه به این‌که موتاسیون بر برخی خصوصیات وابسته که مقدار پروتئین را تغییر می‌دهد تأثیر دارد *ارولبالاچاندران و مولاایناتان* (2009) و همچنین به اثبات رسیده که EMS توان تغییر نوکلئوتیدها و جانشینی نوکلئوتیدهای AT به جای CG را در ژنوم القاء می‌کند که در تغییر پروتئین‌ها تجلی می‌یابد و در نتیجه گیاهان موتانت محتوای پروتئینی متفاوتی نسبت به یکدیگر و گیاهان شاهد پیدا می‌کنند *واتو* (Wattoo, 2012)، می‌توان این‌گونه نتیجه‌گیری کرد که هر غلظتی از EMS بسته به تغییراتی که در ژنوم و یا اپی‌ژنوم ایجاد می‌کند می‌تواند بر محتوای پروتئینی گیاه تأثیرات متفاوتی داشته باشد. تفاوت در باندهای الکتروفورزی پروتئینی ممکن است به‌علت تفاوت در ترکیب و تعداد اسیدهای‌آمینه آن‌ها باشد *استفانو* و همکاران (Stefanov *et al*., 1998) زیرا که حتی تغییر اندک در ترکیب آمینواسیدی پلی‌پپتیدها ممکن است اثر معنی‌داری بر تراکم باندهای پروتئینی داشته باشد *ویلسون* (Wilson, 1986). تفکیک پروتئین‌های استخراج شده از گیاهان و بررسی آن‌ها با استفاده از تکنیک SDS-PAGE امکان‌پذیر است *ماگدا* و همکاران (Magda *et al*., 2006). تغییر در الگوی SDS-PAGE پروتئینی می‌تواند به‌عنوان شاخصی از پتانسیل عملکرد موتاژن‌ها مطرح شود *برکت و حسن* (Barakat and Hassan, 1997). در مورد باندهای پروتئینی به نظر می‌رسد غلظت EMS ۰/۲٪ به‌مدت ۱۵ دقیقه اثر کاهشی زیادی بر بیان باندهای پروتئینی داشته است به‌طوری که در محدوده‌های ۳۵ و۱۸/۴-۲۵ کیلودالتونی کمترین تراکم باندها در گیاهان تیمار شده با EMS با غلظت ۰/۲٪ به‌مدت ۱۵ دقیقه دیده می‌شود. این نتایج با نتایج به‌دست آمده توسط *سستیلی* و همکاران (Sestili *et al*., 2010) در تأثیر EMS بر گندم و کاهش و یا فقدان برخی باندهای پروتئینی مطابقت دارد. کاهش بیان در پروتئین‌ها احتمالاً می‌تواند ناشی از اثرات تیمار بر رونویسی یا فرایند ترجمه باشد. با توجه به این‌که آمینواسیدها نقش مرکزی در متابولیسم گیاه بازی می‌کنند شرایط نامطلوب محیطی و یا استفاده از برخی تیمـــارها که ناشـی از تنش‌های فیزیولوژیک است به‌طور محسوسی بر افزایش یا کاهش آمینواسیدها و مقدار پروتئین داخلی تأثیر دارد ملالا (Malallah, 1998). بیان متفاوت پروتئین‌های مختلف به‌صورت تنظیم مثبت یا منفی مشخص می‌سازد که سیستم پیچیده‌ای برای پاسخ به شرایط مختلف در گیاه وجود دارد. هر غلظتی از EMS بسته به تغییراتی که در ژنوم و یا اپی‌ژنوم می‌گذارد روی گیاه اثر می‌گذارد. بنابراین به‌عنوان یک اصل نمی‌توان گفت که با افزایش مدت تیمار اثر تیمار منفی و یا

مثبت است. با توجه به این‌که کمترین مقدار پروتئین و کمترین بیان باندهای پروتئینی در گیاهان تیمار شده با EMS با غلظت ۲٪ به‌مدت ۱۵ دقیقه وجود دارد و در نتایج حاصل از اندازه‌گیری پارامترهای رشدونموی نیز تفاوت در همین گیاهان با بقیه گیاهان مشاهده شد می‌توان این احتمال را مطرح کرد که کاهش مقدار پروتئین در این گیاهان می‌تواند ناشی از تغییر در ژنوم آن‌ها، تنوعات سوماتیکی و یا در اثر تغییرات اپی‌ژنتیکی باشد.

به‌طورکلی، کاهش یا افزایش برخی از شاخص‌های فیزیولوژیکی در اثر تیمار EMS این احتمال را ایجاد می‌کند که با شناسایی غلظت و مدت زمان بهینه تیمار برای هر گونه گیاهی می‌توان به ایجاد گیاهانی مقاوم یا متحمل به برخی تنش‌ها و یا پرورش گیاهانی با خصوصیات جدید و مفید مبادرت کرد. در این تحقیق بررسی محدوده وسیع‌تری از غلظت و مدت زمان تیمار EMS در گیاهان اطلسی و انجام الکتروفورز دو بعدی به‌منظور تعیین نوع پروتئین‌های تغییر یافته پیشنهاد می‌شود.

منابع:

جهت مطالعه منابع به صفحه‌های ۱۹-۲۰ متن انگلیسی مراجعه شود.