

اثر ۲۴-آپی براسینولید بر جوانه‌زنی و رشد لوله‌گرده اطلسی (*Petunia hybrida* L.) تحت تنش کادمیوم

سید حسن هاشمی^۱، حکیمه علومی^{۲*}، فرخنده رضائزاد^۱ و خسرو منوچهری کلانتری^۱

^۱ کرمان، دانشگاه شهید باهنر کرمان، بخش زیست‌شناسی

^۲ کرمان، دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته، پژوهشگاه علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی، گروه اکولوژی

تاریخ دریافت: ۹۴/۳/۹ تاریخ پذیرش: ۹۴/۷/۷

چکیده

کادمیوم یکی از فلزات سنگین آلوده‌کننده محیط‌زیست محسوب می‌شود که برای گیاهان بسیار سمی است. دانه‌های گرده در مقایسه با بخش‌های رویشی گیاه حساسیت بیشتری نسبت به کادمیوم دارند. براسینواستروئیدهای گیاهی به‌عنوان یکی از هورمون‌های مؤثر در تخفیف صدمات ناشی از تنش‌ها، از جمله فلزات سنگین در گیاهان مطرح هستند. ۲۴-آپی براسینولید یکی از مؤثرترین و باثبات‌ترین براسینولیدهای شناخته شده است. برای ارزیابی اثر کادمیوم بر رویش و رشد دانه‌های گرده و نیز ارزیابی اثر احتمالی ۲۴-آپی براسینولید در تخفیف و کاهش تنش حاصل از فلز سنگین کادمیوم، رویش و رشد دانه‌های گرده گیاه اطلسی در محیط کشت نیمه جامد در ظروف پتری بررسی شد. این آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با ۳ تکرار بررسی گردید. فاکتورهای مورد بررسی عبارت از دو سطح ۲۴-آپی براسینولید شامل ۰ و ۰/۰۵ مولار و شش سطح کلرید کادمیوم شامل ۰، ۱۰، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۳۰۰ میکرومولار بود. نتایج حاصل از آزمایش نشان داد که کادمیوم در غلظت‌های بالاتر از ۱۰۰ میکرومولار به میزان زیاد جوانه‌زنی و رشد دانه‌های گرده را کاهش داد اما در محدوده غلظت‌های پایین‌تر از آن، روند کاهشی کمتری مشاهده شد و حتی غلظت ۱۰ میکرومولار کادمیوم نقش تحریک‌کنندگی در جوانه‌زنی و رشد دانه‌های گرده داشت. از نتایج حاصل از این پژوهش می‌توان بیان کرد ۲۴-آپی براسینولید بطور مؤثری در غلظت‌های بالاتر از ۵۰ میکرومولار کادمیوم موجب افزایش رویش و رشد دانه‌های گرده می‌شود اما در غلظت‌های پایین‌تر در افزایش رویش و رشد دانه‌های گرده تأثیری ندارد.

واژه‌های کلیدی: اطلسی، براسینواستروئید، کادمیوم، دانه گرده

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۳۴۳۳۲۲۳۲۰۳، پست الکترونیکی: oloumi.ha@gmail.com

مقدمه

مختلف به راحتی وارد اتمسفر شده و بطور مستقیم از طریق هوا بر بخش‌های زایشی گیاهان از جمله دانه‌های گرده در ضمن فرایند گرده افشانی اثر بگذارد (۳۲ و ۳۳ و ۴۱).

گزارش‌های زیادی حاکی از آن است که اثرات سمی کادمیوم بر قسمت‌های زایشی نسبت به سایر بخش‌های گیاه زیاده‌تر بوده و این اثرات به‌ویژه بر سلول‌های زایشی

کادمیوم یکی از مهمترین فلزات سنگین آلوده‌کننده محیط زیست می‌باشد که از منابع مختلفی مانند معادن طبیعی، سوخت‌های فسیلی، فاضلاب‌های صنعتی و شهری، آلودگی‌های حاصل از ترافیک شهری، کودها و سموم شیمیایی حاصل می‌شود (۱، ۲، ۱۷، ۲۱، ۲۸ و ۴۲). از آنجایی که کادمیوم دارای نقطه جوش پایین است می‌تواند از طریق بخار حاصل از صنایع و کارخانجات

می‌شوند (۲۰، ۲۳، ۳۵ و ۳۹). آزمایش‌های متعددی نشان داده است که تمامی این هورمون‌ها موجب افزایش رویش و رشد دانه‌های گرده در گونه‌های مختلف گیاهی می‌شوند (۱۹، ۲۰، ۲۵ و ۲۶). از مهمترین استروئیدهای اختصاصی گیاهان می‌توان براسینواستروئیدها را نام برد که برای اولین بار از گرده بالغ گیاه *Brassica napus* استخراج شدند. این استروئیدها در تمامی قسمتهای مختلف گیاهی از جمله دانه گرده، گل، میوه، برگ و ساقه یافت شده و برای رشد و نمو گیاه ضروری هستند. براسینواستروئیدها در تنظیم رشد و تقسیم سلولی، تحریک سنتز اتیلن، سنتز پروتئین و اسیدهای هسته‌ای، فعالیت آنزیم‌ها و فرایندهای مرتبط با نمو زایشی و به‌ویژه کاهش و تخفیف صدمات حاصل از تنش‌های محیطی شامل تنش‌های حاصل از شوری، خشکی، اشعه ماورای بنفش، سرما، گرما و نیز فلزات سنگین در گیاهان نقش مهمی دارند (۹، ۱۵، ۲۹، ۳۴، ۳۵، ۴۳). از میان حدود ۴۰ استروئید شناخته شده در گیاهان، ۲۴-اپی براسینولید یکی از شاخص‌ترین استروئیدها در گیاهان می‌باشد. در آرابیدوپسیس نقش براسینواستروئیدها در تنظیم و رشد و نمو سیستم زایشی نر از طریق تنظیم ژن‌های کلیدی دخیل در این فرایند به اثبات رسیده است (۱۸، ۱۹، ۳۸ و ۴۴). همچنین گزارش شده است که اثر براسینولید بر رویش و رشد دانه‌های گرده نوعی گوجه از سیتوکینین بیشتر است (۱۶). از سوی دیگر تیمار گرده‌های گوجه فرنگی با ۲۴-اپی براسینولید مقاومت آنها را در برابر صدمات ناشی از درجه حرارت‌های بالا در زمان رویش و رشد بیشتر کرده است (۳۵). برخی گزارش‌ها حاکی از آن است که ۲۴-اپی براسینولید به تنهایی هیچ اثری بر رویش و رشد گرده گیاه تنباکو نداشته اما در حضور کوئرستین موجب افزایش رویش و رشد دانه‌های گرده شده است (۴۵). از طرفی برخی گزارش‌ها حاکی از آن است که ۲۴-اپی براسینولید اثری بر نمو سیستم زایشی

از جمله دانه گرده بسیار قابل توجه است (۱۳ و ۳۱). رویش و رشد دانه‌های گرده به مقدار زیاد تحت تأثیر عوامل تنش‌زای بیرونی از جمله فلزات سنگین است، به نحوی که بسیاری از محققان از این حساسیت دانه گرده به‌عنوان یک نشانگر بیولوژیکی برای تشخیص آلودگی هوا و مقایسه میزان سمیت فلزات سنگین در سطح سلولی استفاده می‌کنند (۶ و ۳۲). اهمیت این موضوع از آنجاست که رشد و نمو میوه و دانه تحت تأثیر رویش و رشد دانه گرده قرار دارد. مطالعات نشان داده است که کادمیوم موجب کوچک شدن میوه و نیز کاهش تعداد دانه در میوه می‌شود (۱۰ و ۱۴ و ۴۲). هرچند مرحله تندش و جوانه‌زنی دانه گرده بر روی کلاله و تشکیل لوله گرده، مرحله بسیار مهم و حساسی برای تشکیل دانه و میوه و در نتیجه باروری و تولید نسل است، با این حال در مورد فرایندهای فیزیولوژیکی بیوشیمیایی و مولکولی این مرحله اطلاعات محدودی وجود دارد (۳۵). مطالعات نشان داده است که ترکیبات فنلی مانند فلاونول‌ها نقش مهمی در رویش و رشد دانه‌های گرده دارند. برای مثال گیاه اطلسی تراریخت فاقد توانایی تولید فلاونوئیدها، گرده‌هایی عقیم تولید کرده و این نقصان با اضافه کردن فلاونوئید برطرف می‌شود (۱۲، ۲۴ و ۴۶).

شبهات بین برخی آنزیم‌های مسیرهای بیوسنتزی فلاونوئیدها با گروه دیگری از مواد که در رشد و نمو بسیار مؤثرند، از جمله هورمون‌های استروئیدی، احتمال نوعی ارتباط بین این مواد را بیشتر کرده است. اگرچه فلاونول‌ها و استروئیدها از نظر شیمیایی به هم وابسته نیستند (۱۹ و ۲۰). اما استروئیدها از مدت‌ها قبل در جانوران به عنوان مواد مؤثر در رشد معرفی شده‌اند. بسیاری از این استروئیدها مانند استرون، تستوسترون، استروژن، پروژسترون، استرادیول، استیگما استرول و غیره از گونه‌های مختلف گیاهی استخراج شده‌اند و فرایندهای فیزیولوژیکی متنوعی را در گیاهان موجب

۵ mM تهیه گردید. پس از بهینه‌سازی غلظت، از غلظت‌های صفر (به‌عنوان شاهد) و ۰/۰۵ mM ترکیب ۲۴-اپی‌براسینولید از محلول‌های فوق نیز ساخته شد.

برای بررسی اثر متقابل هورمون با غلظت‌های مختلف کادمیوم بر رویش و رشد دانه‌های گرده، آزمایش فاکتوریل در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی در ۳ تکرار استفاده شد تا اثر غلظت‌های مختلف کادمیوم و هورمون به تنهایی و اثر متقابل این دو با هم بر روی رویش و رشد دانه‌های گرده مورد ارزیابی قرار بگیرد. در هر ظرف پتری ۱۰ میلی‌لیتر از محلول کنترل و تیمارهای مورد نظر ریخته شد و دانه‌های گرده روی محیط کشت پخش شد. پتری‌ها به درون انکوباتور با دمای ۲۵ درجه سانتیگراد در شرایط تاریکی منتقل و پس از ۴ ساعت رویش و رشد گرده‌ها با اضافه کردن ۱ میلی‌لیتر اسید استیک ۴۰ در صد به هر ظرف متوقف گردید. در هر ظرف در صد رویش با شمارش ۱۰۰ دانه گرده توسط میکروسکوپ و میزان رشد با انتخاب ۲۰ لوله گرده بصورت تصادفی و اندازه‌گیری طول توسط میکروسکوپ و با بزرگنمایی ۴۰ توسط میکرومتر بررسی شد. نتایج با استفاده از آنالیز واریانس و برنامه SPSS در سطح ۵ در صد بررسی گردید.

نتایج

جوانه‌زنی دانه گرده: بر اساس نتایج یک افزایش غیرمنتظره در رویش دانه گرده در تیمار ده میکرومولار کادمیوم در مقایسه با گروه شاهد مشاهده گردید. در این غلظت در صد جوانه زنی ۸۱ در صد بود که نسبت به کنترل ۶ در صد افزایش یافت. درصد جوانه زنی در غلظت ۵۰ میکرومولار کادمیوم ۷۳ در صد بود که نسبت به غلظت ۱۰ میکرومولار ۸ در صد کاهش یافت و این کاهش در سطح ۵ در صد معنی‌دار بود. با افزایش غلظت کادمیوم به محدوده غلظت‌های ۱۰۰ و بالاتر از آن میزان رویش دانه‌های گرده به طور چشمگیری کاهش و از ۵۳

در آرابیدوپسیس، در مقایسه با سایر هورمون‌های استروئیدی ندارد (۱۹). بنابر این هر چند نقش هورمون‌های استروئیدی در رویش و رشد دانه‌های گرده در گیاهان مختلف بطور عموم نشان از اثر مثبت این مواد دارد، اما اثر استروئیدهایی مانند ۲۴-اپی‌براسینولید در رویش و رشد دانه‌های گرده در گزارش‌های مختلف گاه با تناقضاتی همراه است (۲۰، ۴۵ و ۴۶).

در این پژوهش تأثیر ۲۴-اپی‌براسینولید بر رویش و رشد دانه‌های گرده گیاه اطلسی تحت تنش کادمیوم در محیط در شیشه مورد بررسی قرار گرفت تا از نتایج حاصل از آن بتوان یکی از مسیرهای احتمالی محافظت از سیستم زایشی گیاهان را در برابر تنش حاصل از فلز سنگین کادمیوم معرفی کرد.

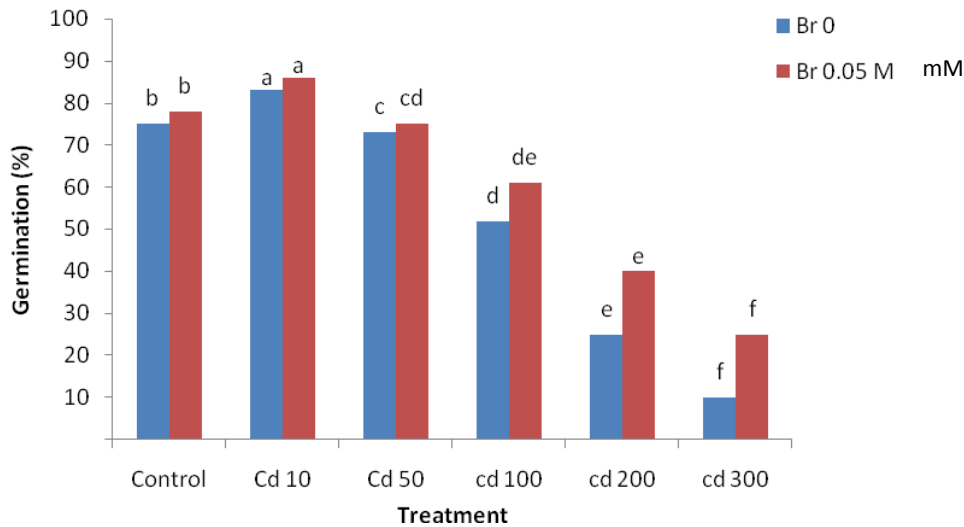
مواد و روشها

دانه‌های گرده گیاه اطلسی (*Petunia hybrida*. L) از گل‌های تازه باز شده کاشته شده در مزرعه تحقیقاتی دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی کرمان، پیش از طلوع آفتاب جمع‌آوری و پس از ۳ ساعت قرارگیری در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد برای حصول بیشترین رویش، درصد رویش گرده و میزان رشد لوله آنها در محیط در شیشه مطالعه و بررسی شد. محیط کشت گرده‌ها شامل ۱۵ گرم ساکارز، ۰/۰۲ گرم سولفات منیزیم، ۰/۰۲ گرم نترات پتاسیم، ۰/۰۲ گرم نترات کلسیم، ۰/۰۴ گرم اسید بوریک و ۱ گرم آگار بود که در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل شد (۴). به منظور بررسی اثر کادمیوم روی رویش و رشد گرده، غلظت‌های مختلف شامل ۰ (کنترل)، ۱۰، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰ میکرومولار کادمیوم بصورت کلرید کادمیوم در محیط کشت ساخته شد.

به منظور بررسی اثر ۲۴-اپی‌براسینولید در کاهش و تخفیف تنش حاصل از کادمیوم، ابتدا از این ماده استوک

کنترل نشان داد که جز در غلظت ۵۰ میکرومولار کادمیوم، سایر غلظت‌های کادمیوم بطور معنی‌داری منجر به کاهش جوانه زنی کرده شد.

در صد در غلظت ۱۰۰ به ۲۵ در غلظت ۲۰۰ میکرومولار و ۱۰ در غلظت ۳۰۰ میکرومولار رسید (شکل ۱). نتایج حاصل از مقایسه تأثیر غلظت‌های بالاتر از ۱۰ میکرومولار کادمیوم بر رویش دانه‌های کرده با

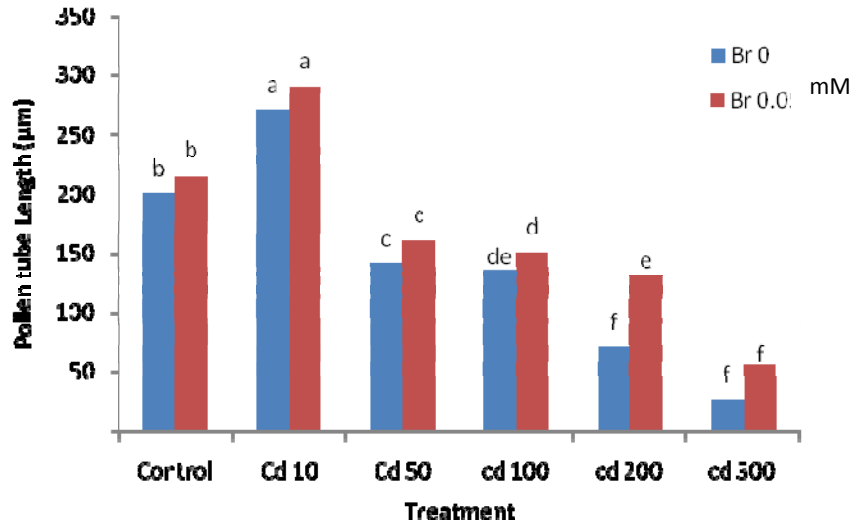


شکل ۱- درصد جوانه‌زنی دانه کرده گیاه اطلسی در تیمار کلرید کادمیوم (میکرومولار) و ۲۴ اپی براسینولید ($p < 0.05$)

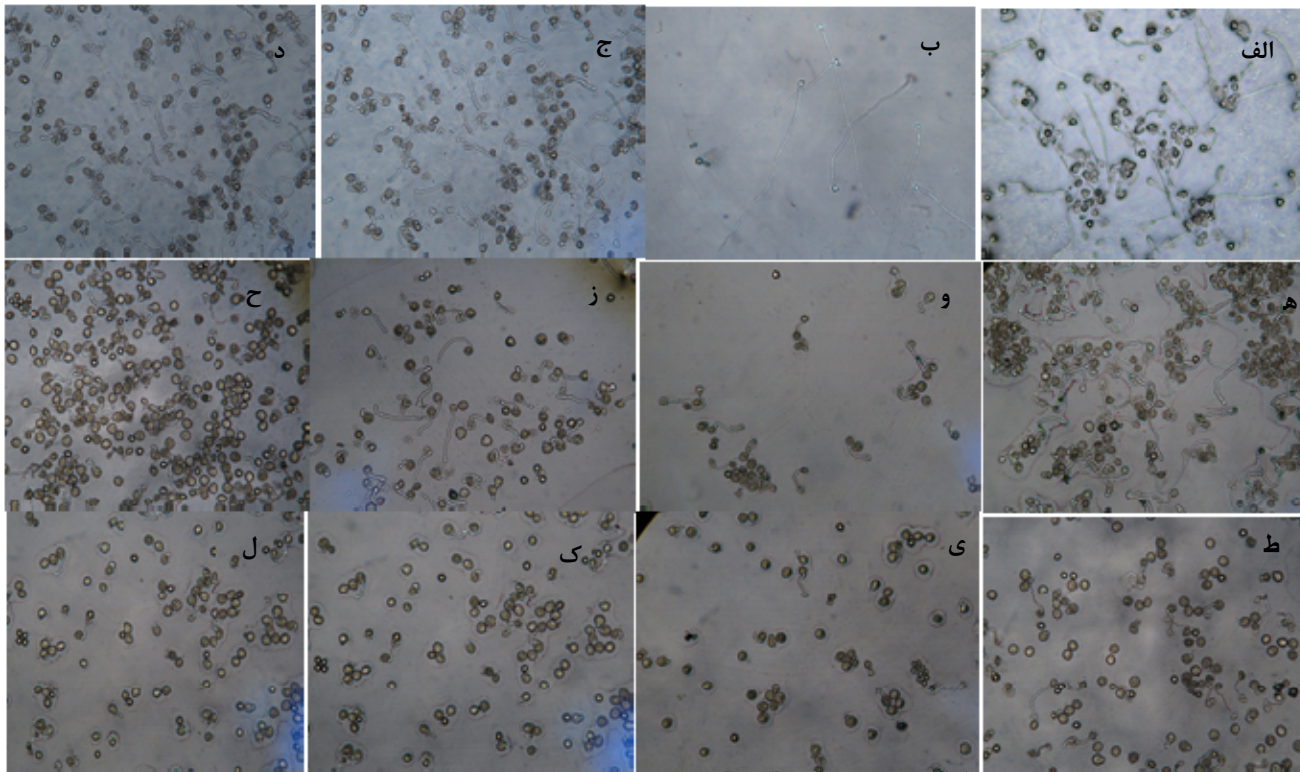
میکرومولار کادمیوم نه تنها موجب کاهش رشد لوله‌های کرده نشد، بلکه در مقایسه با کنترل طول لوله‌های کرده از ۲۰۰ به ۲۴۰ میکرومتر رسید. با افزایش غلظت کادمیوم از ۱۰ به ۵۰ میکرومولار به یک باره طول لوله‌های کرده از ۲۴۰ میکرومتر به ۱۵۰ میکرومتر کاهش یافت. این روند کاهشی در رشد با اضافه شدن غلظت کادمیوم همچنان ادامه یافت، به طوری که در غلظت ۱۰۰ میکرومولار طول لوله کرده به ۱۳۰ میکرون رسید. کاهش طول لوله کرده با شیب تندتری در غلظت‌های ۲۰۰ و ۳۰۰ میکرومولار کادمیوم ادامه یافت، به طوری که طول لوله کرده از ۷۰ در غلظت ۲۰۰ به ۳۰ میکرومتر در غلظت ۳۰۰ میکرومولار کادمیوم رسید (شکل‌های ۲ و ۳). با توجه به شکل (۲) می‌توان نتیجه گرفت که جز در غلظت ۱۰ میکرومولار کادمیوم، سایر غلظت‌ها موجب کاهش معنی‌داری در رشد لوله‌های کرده شد.

مطالعه اثر ۲۴-اپی براسینولید بر رویش دانه‌های کرده نیز نشان دهنده بیشینه درصد جوانه زنی در غلظت ۱۰ میکرومولار کادمیوم بود. در کنترل و غلظت ۵۰ میکرومولار کادمیوم نیز افزایش در صد رویش با اضافه کردن هورمون معنی‌دار نبود و هورمون تنها موجب افزایش ۲ درصدی در رویش دانه‌های کرده شد که این میزان افزایش در سطح ۵ در صد معنی‌دار نبود. اما در غلظت‌های بالاتر از ۵۰ میکرومولار کادمیوم، افزایش درصد رویش دانه‌های کرده با اضافه کردن هورمون، رشد چشمگیری یافت، به طوری که این افزایش در غلظت‌های ۱۰۰، ۲۰۰ و ۳۰۰ میکرومولار کادمیوم به ترتیب ۹، ۱۵ و ۱۵ در صد بود که این افزایش در سطح ۵ در صد معنی‌دار می‌باشد (شکل ۱).

رشد لوله کرده: نتایج حاصل از اثر غلظت‌های مختلف کادمیوم بر رشد دانه‌های کرده نشان داد که غلظت ۱۰



شکل ۲- طول لوله گرده گیاه اطلسی در تیمار کلرید کادمیوم (میکرومولار) و ۲۴ اپی براسینولید ($p < 0.05$)



شکل ۳- جوانه‌زنی گرده و رشد لوله گرده گیاه اطلسی در تیمار کلرید کادمیوم (میکرومولار) و ۲۴ اپی براسینولید پس از ۴ ساعت
 الف و ب: کنترل؛ ج، ه، ز، ط و ک: به ترتیب غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۳۰۰ میکرومولار کلرید کادمیوم؛ د، و، ح، ی و ل: به ترتیب غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۳۰۰ میکرومولار کلرید کادمیوم تیمار شده با غلظت ۰/۰۵ mM براسینواسترونید
 همچنین نتایج نشان دهنده اثر غیر معنی دار هورمون بر طول لوله‌های گرده در کنترل و غلظت ۱۰ میکرومولار کادمیوم بود. اما در محدوده غلظت‌های بالاتر از ۱۰ میکرومولار کادمیوم افزودن هورمون به محیط کشت موجب افزایش معنی داری در رشد لوله‌های گرده شد. به طوری که در غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۳۰۰

نشان داده شده است که کادمیوم رویش و رشد دانه‌های گرده را در دو رقم گیاه ماش (*Vicia angustifolia*) در محدوده غلظت ۰/۰۱ میکروگرم بر میلی لیتر محیط کشت محلول یا بالاتر از آن ممانعت می‌کند، در صورتی که در گونه ای از بارهنگ این غلظت باز دارنده به ۲/۵ میکروگرم بر میلی لیتر یا بیشتر از آن می‌رسد اما در غلظت ۱ میکروگرم در میلی لیتر موجب افزایش رویش و رشد دانه‌های گرده می‌شود (۴۱). Sawidis (۲۰۰۸) نیز یک اثر افزایشی را در رویش و رشد دانه‌های گرده دو رقم چمن تحت تیمار کادمیوم گزارش کرد (۳۱). اثر تحریکی برخی غلظت‌های فلزات سنگین بر افزایش رویش و رشد دانه‌های گرده در گیاهان مختلف توسط بعضی از محققان گزارش شده است. این مسئله به دلیل آن است که این غلظت‌ها قادرند بر فعالیت برخی از آنزیم‌ها اثر تحریکی و افزایش دهنده داشته باشند اما در بالاتر از آن محدوده غلظت فعالیت آنزیم‌های مذکور بطور قابل ملاحظه ای کاهش می‌یابد (۳۱ و ۳۳). در این پژوهش نیز این وضعیت به خوبی مشاهده شد. در حالی که در غلظت ۱۰ میکرومولار به نظر می‌رسد کادمیوم بیشترین اثر تحریک‌کنندگی در رویش و رشد را داشته باشد و به یک باره با افزایش غلظت از ۱۰ به ۵۰ میکرومولار از میزان رویش و رشد به طور معنی داری کاسته شده است و این روند کاهش در رویش و رشد با اضافه شدن غلظت کادمیوم همچنان ادامه می‌یابد. به چنین حالتی یعنی تأثیر محدوده مشخصی از غلظت کادمیوم بر تحریک رویش و رشد دانه‌های گرده به اصطلاح هورمسیس (hormesis) گفته می‌شود (از لغت یونانی hormone به معنای تحریک). این اصطلاح به طور کلی در مورد هر ماده سمی که چنین اثراتی داشته باشد نیز به کار می‌رود و در هنگام تأثیر کادمیوم بر گرده گیاهان *Plantago depressa*، *Acer pseudo platanus* نیز گزارش شده است (۸، ۳۳، ۳۷). البته تأثیر کادمیوم در

میکرومولار این افزایش طول به ترتیب ۲۰، ۳۰، ۸۰ و ۴۰ میکرومتر بود. بدین ترتیب در غلظت ۲۰۰ میکرومولار کادمیوم افزودن هورمون بیشترین اثر را در افزایش طول لوله گرده داشت (شکل ۲).

بحث و نتیجه‌گیری

مطالعات زیادی حاکی از آن است که کادمیوم رویش و رشد دانه‌های گرده را تحت تأثیر قرار می‌دهد (۳، ۷، ۱۳، ۲۲ و ۳۱). اثرات ممانعتی کادمیوم بر رویش و رشد دانه‌های گرده بیانگر اثر کادمیوم بر کارکردهای مهم فیزیولوژیکی مرتبط با این دو فرایند است. البته تأثیر منفی بر آنزیم‌ها به دلیل اتصال به گروه‌های سولفیدریل و نیز ایجاد گونه‌های اکسیژن فعال یکی از اولین آثار تخریبی کادمیوم در سلول‌هاست، همچنین اختلال در تنفس سلولی که در جریان رویش و رشد لوله گرده بسیار حیاتی است، از پیامدهای اثرات منفی کادمیوم بر گرده در حال رویش است (۱۳). برخی مطالعات نشان داده است که سمیت کادمیوم بر بخش‌های رویشی گیاهان به ندرت در غلظت‌های ۰/۰۵ ppm مشاهده می‌شود و حداقل غلظت کادمیوم برای ایجاد سمیت ۰/۱ ppm یا بیشتر از آن است. اما گرده‌ها در غلظت‌های کمتر از آن نیز تحت تأثیر سمیت کادمیوم قرار می‌گیرند (۵، ۲۸ و ۴۱). بر اساس گزارش Mc Kinney (۱۹۹۳)، اثرات سمی برخی فلزات سنگین در برخی از گیاهان در غلظت ۱۰ میکرومولار نیز مشاهده می‌شود (۲۴ و ۴۱). در این پژوهش افزایش غلظت کادمیوم از ۱۰ به ۵۰ میکرومولار موجب کاهش زیاد رشد لوله گرده شد و به نظر می‌رسد غلظت ۱۰ میکرومولار تأثیری بر کاهش رشد لوله گرده ندارد. از سوی دیگر برخی گزارش‌ها نشان داده است که گرده دو لپه‌ای‌ها نسبت به تک لپه‌ای‌ها در برابر کادمیوم حساسیت بیشتری دارند اما در میان دو لپه‌ای‌ها نیز میزان حساسیت به عوامل مختلفی از جمله ویژگی‌های ژنتیکی گیاه وابسته است (۴۱).

دیگر دلایل کاهش رویش و رشد لوله‌گرده بدلیل کادمیوم است (۱۱، ۲۸ و ۳۰).

در این مطالعه ۲۴-پی براسینولید در هنگام تأثیر کادمیوم در غلظت‌های بالاتر از ۵۰ میکرومولار توانست اثر ممانعتی کادمیوم در رویش و رشد لوله‌های‌گرده را کاهش دهد، به عبارتی دیگر هر چند در کنترل و غلظت ۱۰ میکرومولار کادمیوم هورمون اثر معنی‌داری بر افزایش رویش و رشد دانه‌های‌گرده نداشت اما در غلظت‌های بالاتر از ۵۰ میکرومولار کادمیوم به نظر می‌رسد نقش ۲۴-پی براسینولید در کاهش تنش حاصل از این فلز سنگین بیشتر شده است. در این غلظت‌ها افزایش رویش و رشد پس از افزودن هورمون به محیط کشت کاملاً معنی‌دار بود. مطالعات متعددی نشان داده است که ۲۴-پی براسینولید در کشت‌های سلولی موجب افزایش میزان DNA، RNA و پروتئین‌های محلول می‌شود. از طرفی فعالیت آنزیم پراکسیداز به هنگام تیمار این کشت‌های سلولی با هورمون افزایش می‌یابد، زیرا این آنزیم نقش مهمی در توسعه دیواره سلولی داشته و در نتیجه مقدمات افزایش طولی سلول را فراهم می‌آورد (۹ و ۲۷). محققان دیگری نیز گزارش کرده‌اند که تأثیر براسینولید بر افزایش رشد می‌تواند به علت تغییر در تعادل سایر هورمون‌ها بدلیل عملکرد پراکسیداز باشد (۳۹). بنابراین بنظر می‌رسد یکی از دلایل کاهش و تخفیف صدمات حاصل از تنش فلز سنگین کادمیوم بر سلول‌ها، افزایش فعالیت آنزیم‌ها و نیز کاهش و جلوگیری از تخریب آنها به وسیله کادمیوم می‌باشد که توسط گروهی از پروتئین‌های محافظ که در حضور ۲۴-پی براسینولید سنتز می‌شوند، انجام می‌گیرد (۹ و ۲۸). در همین ارتباط گزارش شده است که تیمار کرده‌های گوجه فرنگی با ۲۴-پی براسینولید موجب افزایش رویش و رشد آنها در دماهای بالا می‌شود (۳۵). از سوی دیگر محققان در آزمایشی روی‌گرده گیاه تنباکو به این نتیجه رسیدند که ۲۴-پی براسینولید

کاهش رویش و رشد لوله‌گرده در گزارش‌های زیادی آمده است (۱۳، ۳۲، ۳۳، ۳۶ و ۴۱). در این پژوهش نیز افزایش غلظت کادمیوم موجب کاهش میزان رویش و رشد لوله‌گرده شده، به طوری که غلظت ۳۰۰ میکرومولار کادمیوم بیشترین اثر ممانعتی را بر رویش و رشد لوله‌گرده داشته است. باید دقت داشت که لوله‌گرده بسیار فعال و دارای سیستم ترشحی فعالی است، بنابراین هر گونه اختلال در رشد و توسعه این ساختار باعث کاهش رشد لوله‌گرده می‌شود. تحقیقات نشان داده است که یکی از دلایل کاهش رشد لوله‌گرده در حضور کادمیوم این است که کادمیوم موجب کاهش خاصیت پلاستیسیته دیواره سلولی لوله‌گرده شده و رشد عادی آن را دچار اختلال می‌کند. این اختلال به دلیل اثر متقابل یون‌های فلز سنگین با محتویات آنیونی و زیکول‌های ترشحی و دیواره سلولی لوله‌گرده که حاوی مقادیر زیادی پکتین و کالوز و مقادیر کمی سلولز است، می‌باشد. این ساختار خاص دیواره سلولی لوله‌گرده یعنی زیاد بودن ترکیبات آنیونی در آن (به دلیل ترکیبات پکتیکی) و در نتیجه اتصال کادمیوم به این ترکیبات موجب می‌شود کادمیوم در رشد لوله‌گرده اختلال ایجاد کند (۲۵ و ۴۰). Reiss & Herth (۱۹۷۹) نشان دادند که کادمیوم سازمان یافتگی اندامک‌ها در نوک لوله در حال رشد از جمله وزیکول‌های ترشحی را دچار اختلال می‌کند. این مسئله ممکن است به دلیل عملکرد مستقیم درون سلولی کادمیوم یعنی اتصال پکتین و به هم زدن ترکیبات پکتات کلسیم و نیز اتصال به سایر ترکیبات با بار منفی دیواره سلولی و یا نشانگر واکنش ثانویه سلول به اثرات سمی کادمیوم (تأثیر بر آنزیم‌ها ایجاد رادیکال‌های اکسیژن‌فعال و غیره) باشد. همچنین تأثیر کادمیوم بر سیستم اسکلت سلولی لوله‌گرده به ویژه در نوک آن و در نتیجه اختلال در سازمان یافتگی اندامک‌ها و کاهش رشد راسی لوله‌گرده از

گیاه و اثر متقابل سایر عوامل تأثیرگذار در رویش و رشد دانه‌های گرده دارد.

از نتایج حاصل از این پژوهش می‌توان بیان کرد که غلظت‌های مساوی و بیش از ۵۰ میکرومولار کادمیوم باعث کاهش جوانه‌زنی و رشد لوله گرده گیاه اطلسی (*Petunia hybrida* L) می‌شود. تیمار ۰/۰۵ mM ترکیب ۲۴-اپی براسینولید صدمات حاصل از تنش کادمیوم را در هنگام رویش و رشد دانه‌های گرده در غلظت‌های برابر و بیش از ۱۰۰ میکرو مولار کادمیوم کاهش داده و به بهبود رویش و رشد این گرده‌ها در هنگام تنش کادمیوم کمک می‌کند.

در پایان، نویسندگان از پروردگار مهربان برای آقای سیدحسین هاشمی (دانشجوی دکتری بخش زیست‌شناسی) طلب غفران و آمرزش داشته، امید است روح او با جد بزرگوارش محشور گردد. بنابراین فقدانش بسیار سخت و جایش در بین خانواده و جامعه دانشگاهی بسیار خالی می‌باشد.

تأثیری بر تحریک و افزایش رویش و رشد دانه گرده ندارد. در همین تحقیق اعلام شده است که یک براسینولید مهم دیگر یعنی ۲۸-هوموبراسینولید کاملاً از رویش و رشد دانه گرده تنباکو ممانعت می‌کند و اضافه کردن کوئرستین به محیط کشت نیز این اثر ممانعتی را از بین نمی‌برد (۴۵). همچنین برخی از محققان اعلام کرده‌اند که آراییدوپسیس ۲۴-اپی براسینولید هیچ اثری بر نمو سیستم زایشی ندارد، در صورتی که استفاده از سایر هورمون‌های استروئیدی مثل اندرواسترون، استروژن و پروژسترون موجب افزایش نمو سیستم زایشی می‌شود (۱۹). در آزمایش دیگری بر روی گل داوودی، نشان داده شده است که از میان هورمون‌های استروئیدی، تستوسترون و استیگما استرول بر رویش و رشد دانه‌های گرده این گل مؤثرند، اما همین هورمون‌ها تأثیری بر رویش و رشد دانه‌های گرده گیاه تربچه ندارند (۲۶ و ۱۹). بررسی مجموعه موارد ذکر شده نشان می‌دهد اگرچه هورمون‌های استروئیدی در رویش و رشد دانه‌های گرده مؤثرند، اما این تأثیر بستگی به عوامل متعددی از جمله نوع هورمون استروئیدی، گونه

منابع

۱. صارمی راد، ب، اسفندیاری، ع، شکرپور، م، سفالیان، ا، آوانس، آ و موسوی، س ب (۱۳۹۳) اثر کادمیوم روی برخی از ویژگی‌های ریخت‌شناسی و فیزیولوژیک گندم در مرحله گیاهچه‌ای. مجله پژوهش‌های گیاهی. دوره ۲۷، شماره ۱، بهار، صفحه ۱-۱۱
۲. دژبان، ع؛ شیروانی، ا؛ عطارد، پ؛ دلشاد، م؛ متینی زاده، م. (۱۳۹۴). اثر تنش کادمیوم بر فلورسانس کلروفیل، محتوی رنگدانه‌های کلروفیلی و پرولین برگ نهال‌های داغداغان (*Celtis caucasica* L.) و اقاچیا (*Robinia pseudoacacia* L.) مجله پژوهش‌های گیاهی. انتشار آنلاین از تاریخ ۰۲ خرداد ۱۳۹۴
3. Anuradha S. and Ram Rao S. (2009). Effect of 24-epibrassinolide on photosynthetic activity of radish plants under cadmium stress. *Photosynthetica*. 47(2): 317-320.
4. Bajguz A. and Hayat S. (2009). Effects of brassinosteroids on the plant responses to environmental stresses. *Plant Physiology and Biochemistry*, 47:1-8
5. Bhandal I. S. and Bala R. (1989). Heavy metal inhibition of in vitro pollen germination and pollen tube growth in *Amaryllis vittata*. *Current Science*: 58(7): 379-380
6. Brewbaker J. L. and Kwack B.H. (1964). The calcium ion and substances influencing pollen growth. In: Linskens HF, ed. *Pollen physiology and fertilization*. Amsterdam: Elsevier North Holland, 145-151.
7. Blasberg pahlsson A. (1989). Toxicity of heavy metals (Zn, Cu, Cd, Pb) to vascular plants. *Air and Soil Pollution*. 47, 287-319.
8. Benarides S. M., Gallego M. P. and Tamaro M. L. (2005). Cadmium toxicity in plants. *Brazilian Journal of Plant Physiology*. 17: 21-34

9. Chaney W. and Strickland R. (1984). Relative Toxicity of Heavy Metals to Red Pine Pollen Germination and Germ Tube Elongation. *Journal of Environmental Quality*, 13:391-394.
10. Calabrese E.J. (1999). Evidence tha hormesis represents an overcompensation response to adisruption in homeostasis. *Ecotoxicology Environmental Safety*, 42:135-137.
11. Cag S., Gren N., Cingil-baris C. and Kaplan E. (2007). The effect of different concentration of epibrassinolide on chlorophyll, protein and anthocyanin content and peroxidase activity in excised red gabbage cotyledone. *Biotechnology and Biotechnology Equipments*. 21-24
12. Cox R. M. (1988). The sensitivity of pollen from various coniferous and broad-leaved trees to combinations of acidity and trace metals. *New Phytologist*. 9:193-201.
13. Dubay D. T. and Murdy W. H. (1983). Direct advers effects of SO₂ on seed set in *Geranium carolinianum* L. A consequence of reduced pollen germination on the stigma. *Botanical Gazette*. 14:376-381.
14. Groot S.P.C. and Ruiter W. (1993). Stimulation of tomato pollen germination by the flavonoid quercetin in report of the tomato. *Genetics cooperative*. Cornell university, Ithaca, N.Y. PP:19-20.
15. Gür N. and Topdemir A. (2008). Effects of Some Heavy Metals on *in vitro* Pollen Germination and Tube Growth of Apricot (*Armenica vulgaris* L.) and Cherry (*Cerasus avium* L.). *World Applied Science Journal*. 4 (2): 195-198, 2008.
16. Gonzalez E. B., Lao J. L. and Cuevas J. (2006). Pollen load affects fruit set, size and shape in cherimoya. *Scientia Horticulture*. 110: 51-56
17. Hayat S., Ali B., Aiman Hasan S. and Ahmad A. (2007). Brassinosteroid enhanced the level of antioxidants under cadmium stress in *Brassica juncea*. *Environmental and Experimental Botany*. 60: 31-41.
18. Hewitt F.R, Hough T., Oneill P., Sasse J.M., Williams E.G. and Rowan K.S. (1985). Effect of Brassinolide and other growth regulators on the germination and growth of pollen tubes of *Prunus avium* using a multiple Hanging-drop assay. *Australian Journal of Plant Physiology*. 12(2): 201 – 211.
19. Heumann H.G. (1987). Effect of heavy metal on growth and ultra structure of *Chara vulgaris*. *Protoplasma*. 136:37-48.
20. Jaime A. da Silva T. (2013). 24-Epibrassinolide and 28-homobrassinolide, two brassinosteroids, inhibit protocorm-like body development in hybrid *Cymbidium* (Orchidaceae). *Journal of Horticulture, Forestry and Biotechnology*, 17(4), 22- 27
21. Janeszko A., Filek W., Biesaga-Koscielniak J., Marcinska I. and Janeszko Z. (2003). The influens of animal sex hormones on the induction of flowering in *Arabidopsis thaliana*: Comparison with the effect of 24-epibrassinolide. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 72: 147-151.
22. Janeszko A. and Skoczowski A. (2005). Mammalian sex hormones in plants. *Folia Histochemica Et Cytobiologica*. 43-2:71-79.
23. Kabata-pendais A. And Pendais H. (1984). *Trace Element in soil and plants*. CRC press, Boca Roton, FL.
24. Levent A. and Tuna B. (2002). The Effects of Heavy Metals on Pollen Germination and Pollen Tube Length in the Tobacco Plant. *Turkish Journal of Biology*, 26: 109-113.
25. Liu Y., Zhao Z., Si J., Di C., Han J. and An L. (2009). Brassinosteroids alleviate chilling-induced oxidative damage by enhancing antioxidant defense system in suspension cultured cells of *Chorispora bungeana*. *Plant Growth Regulation*, 59:207–214
26. Mc Kinney J. (1993). Metals bioavailability and disposition, kinetics research. *Toxicology and Environmental Chemistry*. 38:1-71.
27. Matsubara S. and Miki N. (1992). Germination promoters of radish pollen cultured in vitro. *Japan. Society of Horticultural Science*. 61(1) 79-84.
28. Matsubara M. and Tsukamoto Y. (1968). Studies on germination of chrysanthemum pollen. Substance promoting germination. *Plant Cell Physiology*. 9:565-572.
29. Neog B. and Singh I.D. (2004). Peroxidase, polyphenol oxidase and acid phosphatase activities in the stigma-style tissue of *Camellia sinensis* (L) O. Kuntze following compatible and incompatible pollination. *Journal of Indian Institute Sciences*, 84: 47-52.

30. Prasad M.N.V. (1995). Cadmium toxicity and tolerance in vascular plants. *Environmental and Experimental Botany*. 35: 525-545.
31. Priya A.; Bhardwaj R; Kanwar M. K. (2010) 24-epibrassinolide regulated diminution of Cr metal toxicity in *Brassica juncea* L. plant. *Brazilian Journal of Plant Physiology*. 22(3): 159-165
32. Reiss H.D. and Herth W. (1979). Calcium ionophor A23187 affects localized wall secretion in the tip region of pollen tube of *Lilium longiflorum*. *Planta*. 145:225-232.
33. Sawidis T. (2008). Effect of cadmium on pollen germination and tube growth in *Lilium longiflorum* and *Nicotiana tabacum*. *Protoplasma*, 233: 95–106.
34. Sawidis T. and Reiss H. R. (1995). Effects of heavy metals on pollen tube growth and ultra structure. *Protoplasma*. 185:113-122.
35. Stebbing A.R.D. (1982). Hormesis the stimulation of growth by low levels of inhibitors. *Science of the Total Environment*. 22:213-234.
36. Shahbaz M. and Ashraf M. (2007). Influence of exogenous application of brassinosteroid on growth and mineral nutrients of wheat under saline conditions. *Pakistan Journal of Botany*, 39(2):513-522
37. Singh I. and Shono M. (2005). Physiological and molecular effects of 24-epibrassinolide, a brassinosteroid on thermotolerance of tomato. *Plant Growth Regulation*, 47:111–119.
38. Tuna, L., Burun B., Yokas I. and Coban E. (2002). The effects of heavy metals on pollen germination and pollen tube length in the tobacco plant. *Turkish Journal of Biology*. 26: 109-113.
39. Turner A.P., Dickinson N.M. and Lepp N.W. (1991). Indices of metal tolerance in trees. *Water, Air and Soil Pollution*. 58:617-625.
40. Ulrich K. and Wang Z.Y. (2012) Brassinosteroid action in flowering plants: a Darwinian perspective. *Journal of Experimental Botany*. doi:10.1093/jxb/ers065 pp: 1-12
41. Vardhini B.V. and Naser A. Anjum (2015) Brassinosteroids make plant life easier under abiotic stresses mainly by modulating major components of antioxidant defense system. *Frontier in Environmental Sciences*. Doi:10.3389/fenvs.2014.00067
42. Verborgen N., Hermans C. and Schat H. (2009). Molecular mechanisms of metal hyperaccumulation in plants. *New Phytologist*. 181(4):759-776.
43. Wierzbicka M. H., Przedpelska E., Ruzik R., Ouerdane L., Polec'-Pawlak K., Jarosz M., Szpunar J. and Szakiel A. (2007). Comparison of the toxicity and distribution of cadmium and lead in plant cells. *Protoplasma*, 231: 99–111
44. Xiong Z. T. and Peng Y.H. (2001). Response of pollen germination and tube growth to cadmium with special reference to low concentration exposure. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 48 (1): 51-55.
45. Yajie L., Zhiguang H., Jing S., Cuixia D., Jin H. and Lizhe A. (2009). Brassinosteroids alleviate chilling-induced oxidative damage by enhancing antioxidant defense system in suspension cultured cells of *Chorispora bungeana*. *Plant Growth Regulation*, 59 (3): 207- 214.
46. Ye Q., Zhu W., Li L., Zhang S., Yin Y., Ma H. and Wang X. (2010). Brassinosteroids control male fertility by regulating the expression of key genes involved in Arabidopsis anther and pollen development. *PNAS*: 107(13)6100-6105
47. Ylstra B., Busscher J., Franken J., Hollman PCH., Mol JNM. and Van Tunen AJ. (1994). Flavonols and fertilization in *Petunia hybrida*: Localization and mode of action during pollen tube growth. *Plant Journal*. 6: 201-212.
48. Ylstra B., Touraev A., Brinkmann A. O., Heberle-Bors E. and Van Tunen A.J. (1995). Steroid hormones stimulate germination and tube growth of in vitro matured tobacco pollen. *Plant Physiology*. 107:639-643.

The effect of 24- Epibrassinolid on germination and tube growth of in vitro *Petunia hybrida* L. pollen under cadmium stress

Hashemi H.¹, Oloumi H.², Rezanejad F.¹, M. Kalantari Kh.¹

¹ Biology Dept., Shahid Bahonar University, Kerman, I.R. of Iran

² Ecology Dept., Institute of Science and High Technology and Environmental Sciences, Graduate University of Advanced Technology, Kerman, I.R. of Iran

Abstract

Cadmium is one of environmental pollutant heavy metals that is very toxic for plants. Pollen grains are more sensitive than vegetative parts of plant to cadmium. Brassinostroids are a group of effective hormones in ameliorative in various biotic and abiotic stresses in plants. To evaluate the effect of 24- epibrassinolid on alleviation of cadmium stress on *Petunia hybrida* L., pollen germination and tube growth of plants were screened in semi-solid medium on Petri-dishes. The experiment was laid out using split plot experiment based on a randomized complete block design with three replications. The main factors were two epibrasinid levels (0 and 0.05 mM) and six cadmium (CdCl₂) concentration including 1, 10, 50, 100, 200 and 300 μM. It was observed that cadmium in concentrations more than 100 micromolar decreased germination and growth of pollen tube grains, while, Cd in 10 μM stimulated germination of pollens. 24-Epibrassinolid in higher concentrations than 50 μM of cadmium increased germination and growth of pollen grains, but in lower concentrations did not have any effect on pollen germination and tube growth. Concentration of 10 μM Cd increased pollen tube length in comparison with control. Based on the results, it can be concluded that 24-epibrassinolide did not increase pollen tube length in control and 10 μM Cd. However, in concentrations higher than 10 μM, hormone treatment increased growth of pollen tubes significantly.

Key words: 24 Epi-Brassinosteroid, Cadmium, *Petunia hybrida*, Pollen tube