مجله علمی ترویجی گل و گیاهان زینتی (۱۳۹۷)، ۳(۱): ۲۷-۳۷

القای موتاسیون در گیاه لیلیوم (*Lilium longiflorum*) با استفاده از پرتو گاما در شرایط درون شیشه‌ای

کیخا فاطمه*[۱]، یزدی محبوبه[۲]، شریفی احمد[۱]، نعمتی زهرا[۳]، خادم آزاده[۲،۱]، باقری عبدالرضا[۲]

۱. گروه بیوتکنولوژی گیاهان زینتی، جهاد دانشگاهی، مشهد، ایران.

۲. گروه بیوتکنولوژی و به نژادی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی، مشهد، ایران.

۳. گروه علوم باغبانی و فضای سبز، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی، مشهد، ایران.

* keykhafatemeh@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۰۵/۱۱، تاریخ بررسی مجدد: ۱۳۹۶/۰۶/۲۲، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۰۹/۱۸

چکیده

اصلاح و تولید ارقام جدید گیاهان زینتی و تکثیر و پرورش آن‌ها صنعتی رو به رشد و در حال گسترش است. بدلیل جایگاه لیلیوم در بازارهای داخلی و خارجی و ارزش این گیاه زینتی به عنوان چهارمین گل شاخه بریده دنیا، انجام تحقیقات منسجم برای افزایش تنوع در این گیاه ضروری به نظر می‌رسد. این پژوهش با هدف بررسی اثر پرتوی گاما بر القای جهش در گیاه لیلیوم در شرایط درون شیشه‌ای و شناسایی تغییرات ژنتیکی با استفاده از نشانگر مولکولی ISSR انجام شد. تیمار تابشی پس از باززایی ریزنمونه‌های لایه سلولی نازک[۱] فلس‌های پیاز رقمOT Yellow در محیط کشت MS حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر BA و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA با دُزهای ۲، ٦ و ۱۰ گری پرتو گاما کبالت ٦۰ اعمال شد. بررسی تغییرات مولکولی موتانت‌های حاصل از القای پرتو گاما با نشانگر ISSR نشان داد که تیمار جهش توانسته چندشکلی نسبتاً بالایی در آن‌ها ایجاد کند. با توجه به نتایج بدست آمده از این تحقیق تمامی تیمارها باعث تغییرات ژنتیکی شده‌اند اما تیمار تابشی با شدت ۲ گری از لحاظ ایجاد تنوع و همچنین عدم اختلال در باززایی ریزنمونه‌ها کارآمدتر بوده است. همچنین نشانگر ISSR قدرت تمایز خوبی را به منظور تعیین تنوع ژنتیکی نشان داده است. این نتایج نشان‌دهنده قدرت و کارایی پرتو گاما در ایجاد تنوع ژنتیکی می‌باشد که به‌نژادگر را جهت بهبود واریته‌های گیاهی با خصوصیات مطلوب کمک می‌نماید.

کلمات کلیدی: پرتو گاما، لیلیوم، موتاسیون، نشانگر مولکولی، ISSR.

[۱] Thin Cell Layer (TCL)

[Downloaded from flowerjournal.ir at 23:55 +0330 on Tuesday December 15th 2020]

[DOR: 20.1001.1.26765993.1397.3.1.3.0]

مقدمه

گیاهان زینتی از لحاظ اقتصادی از اهمیت قابل توجهی برخوردارند. افزایش تقاضا برای تولید این گیاهان، نشان‌دهنده ضرورت بکارگیری روش‌های جایگزین به منظور افزایش تنوع و بهبود عملکرد گیاهان زینتی است (Afrasiab 2006). القای موتاسیون به عنوان یکی از منابع ایجاد تنوع می‌تواند قابلیت‌های بالقوه ژنتیکی را که بطور طبیعی بروز نمی‌یابند، ایجاد نماید (Bagheri *et al.* 2008). به عبارت دیگر القای موتاسیون به یک روش پایدار برای ایجاد تنوع درون واریته‌های گیاهی تبدیل شده است. این روش احتمال القای تنوع جدیدی را که در طبیعت وجود ندارد یا در طول تکامل از دست رفته است، افزایش می‌دهد (Maluszynski *et al.* 2000; Danesi 1991).

محققان از تکنیک القای موتاسیون به عنوان ابزاری مناسب برای ایجاد یا افزایش سریع تنوع در گونه‌های گیاهی استفاده می‌کنند (Niks *et al.* 1994; Brunner 1995). بطورکلی در میان تکنیک‌ها و منابع ژنتیکی در دسترس برای القای موتاسیون، موتاژن‌های فیزیکی پتانسیل مناسبی را برای کاربرد در برنامه‌های اصلاحی خصوصاً در گیاهان باغی نشان می‌دهند (Phuong Thao *et al.* 2003).

تلاش‌های صورت گرفته با استفاده از عوامل جهش‌زا به منظور القای تنوع در شرایط طبیعی در گیاهان زینتی موجب افزایش تنوع و تولید ارقام دارای ویژگی‌های متمایز شده است، با این حال بدلیل نامشخص بودن تغییرات فنوتیپی حاصل از جهش القایی توسط عامل جهش‌زا، هزینه‌های نگهداری جمعیت اصلاحی در شرایط طبیعی به منظور شناسایی گیاهان موتانت مفید و امکان تفرق صفات در روش طبیعی بدلیل تکثیر گیاهان از طریق بذر، کارآمدی این روش با مشکل مواجه شده است. همچنین مشکل اصلی در استفاده از عوامل جهش در شرایط برون شیشه‌ای، دسترسی به جمعیت‌های بزرگ برای بروز موتاسیون می‌باشد که پیش نیاز اساسی برای بدست آوردن تنوع کافی است. با این حال به نظر می‌رسد که با کشت بافت و انتخاب درون شیشه‌ای، این مشکل بر طرف شده است. استفاده از علم کشت بافت گیاهی به عنوان راهکاری موثر به منظور کوتاه نمودن دوره اصلاح موتاسیونی و افزایش کارایی آن مورد توجه قرار گرفته است (Dita *et al.* 2006).

در روش‌های جهش‌زایی درون شیشه‌ای می‌توان با استفاده از نشانگرهای مختلف به بررسی تنوع ژنتیکی پرداخت و انواع موتانت را شناسایی نمود. به عبارت دیگر کاربرد همزمان نشانگرهای مولکولی با القای موتاسیون منجر به تشخیص زودهنگام گیاهان موتانت می‌شود (Brown & Thorpe 1995). بطور کلی تولید گیاهان زینتی موتانت با استفاده از کاربرد عوامل جهش‌زا همراه با بهره‌گیری از علم کشت بافت گیاهی به عنوان یکی از راهکارهای موثر برای پیشبرد اهداف اصلاحی در این گیاهان مورد توجه قرار گرفته است.

لیلیوم گیاهی چند ساله و مقاوم به سرما است که متعلق به جنس *Lilium* و خانواده لیلیاسه[۲] می‌باشد. این گیاه در اروپا و آمریکا بطور گسترده به عنوان گل شاخه بریده و گیاه گلدانی مورد استفاده قرار می‌گیرد. در تنها تحقیق انجام شده بر روی این گیاه، پیازها با دُزهای صفر، ۰/۵، ۱، ۱/۵، ۲ و ۲/۵ گری پرتو گاما تیمار شدند. در این آزمایش دُز ۱ گری به عنوان بهترین دُز برای القای تنوع در نظر گرفته شد، به این دلیل که ۵۵ درصد نمونه‌ها در این دُز سالم باقی مانده و باززا شدند و درصد تنوع القا شده در این دُز بیشتر از سایر تیمارهای تابشی و معادل ۳۹/۲ درصد بود (Xi *et al.* 2012). از اینرو بدلیل جایگاه لیلیوم در بازار داخلی و خارجی و ارزش این گیاه زینتی به عنوان چهارمین گل شاخه بریده دنیا، انجام تحقیقات منسجم برای افزایش تنوع

[۲] Liliaceae

[Downloaded from flowerjournal.ir at 23:55 +0330 on Tuesday December 15th 2020]
[DOR: 20.1001.1.26765993.1397.3.1.3.0]

در این گیاه ضروری می‌باشد. بدین منظور این پژوهش با هدف بررسی اثر پرتو گاما بر القای جهش در این گیاه با استفاده از نشانگر مولکولی ISSR در شرایط درون شیشه‌ای انجام شد.

مواد و روش‌ها

تهیه ریزنمونه و اعمال موتاسیون

به منظور شکستن خواب پیاز، پیازهای تازه تهیه شده گیاه لیلیوم (*Lilium longiflorum*) رقم OT Yellow از یکی از تولید کنندگان گل لیلیوم در شهر مشهد خریداری و به مدت یک ماه در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. به منظور ضدعفونی سطحی، فلس‌های پیازها جدا شده و به مدت نیم ساعت زیر آب جاری قرار گرفتند و سپس به مدت ۱۵ دقیقه با هیپوکلریت سدیم ۲ درصد و پس از آن به مدت ۱۰ دقیقه با محلول کلرید جیوه ۰/۱ درصد تیمار شدند. شستشوی فلس‌ها با آب مقطر استریل در زیر هود لامینار، ۳ بار هر بار به مدت ۵ دقیقه انجام شد. از آنجایی که ضخامت ریزنمونه‌های فلس، تعیین کننده میزان نفوذ پرتو گاما و تاثیر آن در القای جهش می‌باشد، فلس‌ها به قطعاتی با ضخامت ۳ میلی‌متر برش داده شدند. ریزنمونه-های آماده شده در محیط کشت MS حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر BA و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA کشت شدند. نمونه-ها به سازمان انرژی اتمی ایران واقع در تهران منتقل شده و با دُزهای ۲، ٦ و ۱۰ گری پرتو گاما کبالت ٦۰ تیمار شدند. بدلیل ضخامت کم لایه‌های سلولی و گزارش‌های منتشر شده توسط سایر محققان (Xi *et al.* 2012)، کمترین دُزهای پرتو گاما موجود در سازمان انرژی اتمی ایران در این تحقیق مورد استفاده قرار گرفت. برای هر تیمار ۱۰ پتری دیش که هر یک حاوی ۵ ریزنمونه بود در نظر گرفته شد. پس از تیمار ریزنمونه‌ها بدلیل حذف اثر منفی تابش، واکشت مجدد آن‌ها در محیط کشت با ترکیب هورمونی مشابه انجام شد. به منظور رشد بیشتر، هنگامی که اندازه شاخساره‌ها به ۳ سانتی‌متر رسید، شاخساره‌ها از ریزنمونه اولیه جدا شده و در محیط کشت با ترکیب هورمونی مشابه به مدت دو ماه واکشت شدند (شکل ۱). پس از آن شاخه-های رشد یافته به مدت یک ماه در محیط کشت MS ۱/۲ قرار گرفتند تا ریشه تولید کنند. سپس گیاهچه‌ها برای سازگاری به محیط حاوی کوکوپیت و پرلیت به نسبت ۱:۱ انتقال یافتند.

استخراج DND

استخراج DNA از بافت برگ گیاهچه‌های سازگار شده که با سه دُز پرتو گاما تیمار شده بودند و گیاهچه‌های شاهد بر اساس کیت ستونی استخراج DNA شرکت دنازیست آسیا (S-1030) و دستور العمل موجود در کیت انجام شد.

آنالیز *ISSR*

۱۲ آغازگر ISSR (جدول ۱) که در تحقیقات قبل روی لیلیوم و سایر گیاهان زینتی استفاده شده بودند (Xi *et al.* 2012) انتخاب و توسط شرکت دنازیست آسیا سنتز شدند.

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز

زمان و دمای لازم برای مراحل مختلف تکثیر با استفاده از آغازگرهای ISSR به صورت زیر تنظیم شد:

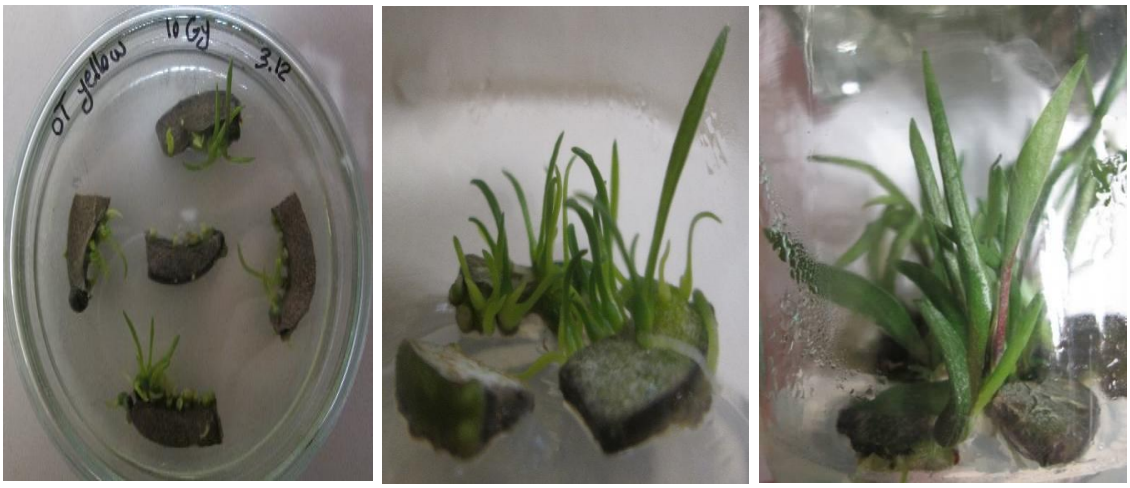
واسرشت اولیه در دمای ۹٤ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، ٤۰ چرخه تکثیر شامل واسرشت در دمای ۹٤ درجه به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال آغازگر در دمای اتصال ویژه آن (جدول ۱) به مدت ۱ دقیقه، گسترش در دمای ۷۲ درجه به مدت ۱ دقیقه و واسرشت نهایی در دمای ۷۲ درجه به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد.

تعیین فاصله ژنتیکی

به منظور تعیین فواصل ژنتیکی، الگوی باندی حاصل از ۱۲ آغازگر با استفاده از نرم افزار Total Lab به صورت صفر و یک کد گذاری شد. سپس ماتریس شباهت ژنتیکی با

[Downloaded from flowerjournal.ir at 23:55 +0330 on Tuesday December 15th 2020]
[DOR: 20.1001.1.26765993.1397.3.1.3.0]

استفاده از ضریب تعیین فاصله جاکارد و روش کلاستر بندی UPGMA توسط نرم افزار NTSYS.2 رسم گردید.



شکل ۱- باززایی و رشد شاخه‌های حاصل از ریزنمونه‌های لایه سلولی نازک گیاه لیلیوم رقم OT Yellow که به ترتیب از راست به چپ با دُزهای ۲، ٦ و ۱۰ گری پرتو گاما تیمار شدند.

جدول۱- آغازگرهای ISSR انتخاب شده به منظور شناسایی تنوع القا شده در گیاه لیلیوم.

نام آغازگر	توالی آغازگر	دمای اتصال	نام آغازگر	توالی آغازگر	دمای اتصال
UBC-824	$(TC)_8G$	52.4	**3A21**	$(TG)_7ACC$	52.4
UBC-853	$(TC)_8RT$	51.6	**3A39**	$(CA)_7GTA$	50
3A01	$(GA)_8TC$	53.9	**3A42**	$(GACA)_4C$	52.4
3A07	$(AG)_7CTT$	50	**UBC-873**	$(GACA)_4$	48.2
3A62	$(TG)_7ACT$	50	**UBC-815**	$(CT)_8G$	52.4
UBC-843	$(CT)_8RA$	54	**UBC 845**	$(CT)_8RG$	52

R: A or G

نتایج و بحث

پس از تیمار ریزنمونه‌های TCL گیاه لیلیوم با گذشت دوره زمانی ۲-۱/۵ ماه، خصوصیات رشدی از قبیل درصد باززایی، میانگین تعداد گیاهچه در هر ریزنمونه و ارتفاع گیاهچه‌ها در تیمارهای تابشی ۲، ٦ و ۱۰ گری مورد بررسی قرار گرفت. طبق نتایج، با افزایش دُز تابشی به میزان ٦ و ۱۰ گری، میزان باززایی ریزنمونه‌ها نسبت به کاربرد دُز ۲ گری کاهش یافته بود. همچنین تفاوت معنی‌داری در درصد

[Downloaded from flowerjournal.ir at 23:55 +0330 on Tuesday December 15th 2020]
[DOR: 20.1001.1.26765993.1397.3.1.3.0]

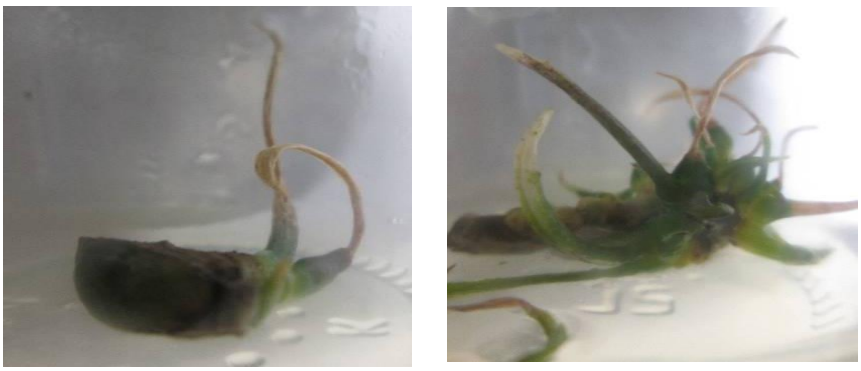
باززایی تیمار شاهد (عدم القای جهش) و دُز ۲ گری مشاهده نشد (جدول ۲). علاوه بر این در دُزهای بالاتر (٦ و ۱۰ گری) شاخه‌های باززا شده ۱۰ تا ١٤ روز پس از باززایی بتدریج زرد شده و از بین رفتند (شکل ۲). در تحقیقات انجام شده توسط سایر محققین نیز، دُزهای پایین پرتو گاما، اثری بر باززایی ریزنمونه‌ها نداشته است در حالی‌که دُزهای بالاتر پرتو گاما سبب کاهش باززایی و از بین رفتن نمونه-های باززا شده داشته است (Lu *et al*. 2007; Farjadi-shakib *et al*. 2010). علاوه بر این نتایج آزمایش نشان داد که بیشترین تعداد گیاهچه در هر ریزنمونه و حداکثر ارتفاع گیاهچه در بین تیمارهای تابشی اعمال شده، در دُز تابشی ۲ گری بدست آمد (جدول ۲).

در تیمار گلچه‌های گیاه داوودی (*Chrysanthemum morifolium*) با دُزهای بالای پرتو گاما نیز، کاهش معنی‌داری در ارتفاع گیاهچه‌ها و تعداد گیاهچه‌های بدست آمده گزارش شد (Barakat *et al*. 2010). همچنین با تابش دُز بالا پرتوی گاما (٦۰ گری) به ریزنمونه‌های کالوس گیاه ژربرا (*G. jamesonii*) گیاهچه‌های جهش یافته‌ای بدست آمد که ارتفاع آن‌ها به نصف ارتفاع گیاهچه‌های طبیعی کاهش یافته بود. شدت بالای تابش با اثر بر غشا و دیواره سلولی از جذب آب توسط سلول‌های گیاهی جلوگیری کرده و در مسیر بیوسنتزی هورمون‌ها نیز اختلال ایجاد می‌کند. این تغییرات فیزیولوژیکی در مجموع منجر به کاهش ارتفاع گیاهچه‌های جهش یافته ژربرا شده است (Hasbullah *et al*. 2012).

جدول ۲- مقایسه میانگین دُزهای مختلف پرتو گاما بر خصوصیات رشدی ریزنمونه‌های لیلیوم در شرایط درون شیشه‌ای.

دُز پرتو گاما (Gy)	درصد باززایی (٪)	میانگین تعداد گیاهچه در هر ریزنمونه	میانگین ارتفاع گیاهچه (cm)
۰	۱۰۰ ^{a}	۲/۸۸٦ ^{a}	۳/۱٦٦ ^{a}
۲	۱۰۰ ^{a}	۲/۱۰٦ ^{b}	۲/۵۰۰ ^{b}
٦	۷۷/۳۳ ^{b}	۱/۲۲۰ ^{cd}	۱/۰۰۰ ^{de}
۱۰	۷۷/۳۳ ^{b}	۱/۰۵۳ ^{cde}	۱/۰۰۰ ^{de}

حروف مشترک بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد آزمون دانکن می‌باشد.



شکل ۲- زرد شدن و از بین رفتن شاخه‌های القا شده حاصل از ریزنمونه‌های TCL گیاه لیلیوم، تیمار شده با دُزهای ٦ (سمت راست) و ۱۰ گری (سمت چپ) پرتو گاما.

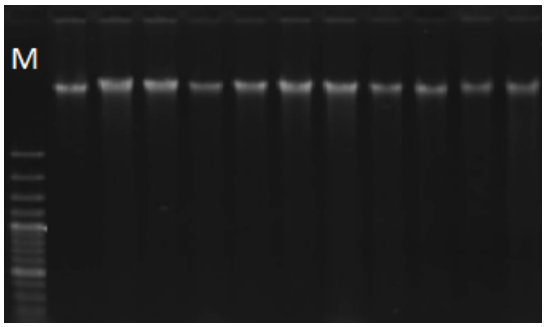
[Downloaded from flowerjournal.ir at 23:55 +0330 on Tuesday December 15th 2020]
[DOR: 20.1001.1.26765993.1397.3.1.3.0]

[Downloaded from flowerjournal.ir at 23:55 +0330 on Tuesday December 15th 2020]

[DOR: 20.1001.1.26765993.1397.3.1.3.0]

آنالیز نمونه‌های تیمار شده با پرتو گاما با استفاده از نشانگر ISSR

ارزیابی کمی و کیفی DNA استخراج شده نشان داد که نمونه‌ها از کمیت و کیفیت بالایی برخوردار می‌باشند (شکل ۳). غلظت DNA استخراج شده در اکثر موارد بیش از ۱۰۰ نانوگرم در میکرولیتر بود. همچنین نسبت جذب در طول موج ۲۶۰ به ۲۸۰ بطور متوسط بین ۱/۸ تا ۲ بود.

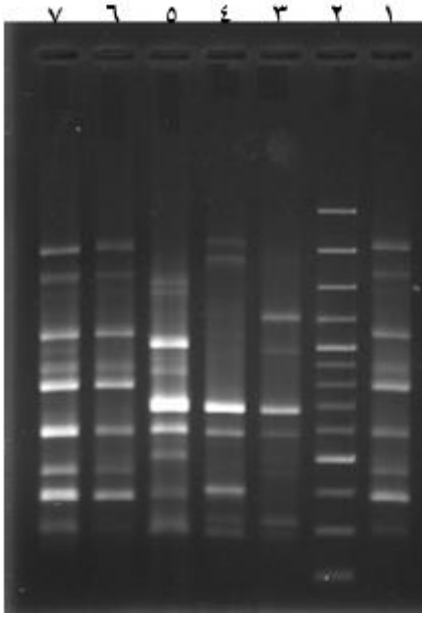


شکل ۳- استخراج DNA ژنومی برخی از موتانت‌های احتمالی گیاه لیلیوم بر روی ژل آگارز ۱ درصد.

مشاهده الگوهای باندی ISSR در موتانت‌های احتمالی رقم OT Yellow لیلیوم

تغییرپذیری ژنتیکی ۱۳ موتانت احتمالی لیلیوم که از سه سطح تیمار تابش (۲، ٦ و ۱۰ گری پرتو گاما کبالت ٦۰) بدست آمده بودند و ۳ شاهد با استفاده از ۱۲ آغازگر ISSR آنالیز شدند. از۱۲ آغازگر بررسی شده، ۱۱ آغازگر باندهای چند شکل در بین موتانت‌های احتمالی مورد مطالعه تولید کردند که در مجموع ۹٦ باند امتیازدهی شد که ٦۳ باند، چند شکلی نشان دادند. تعداد باندها از ۵ باند برای آغازگر UBC853 تا ۱٤ باند برای آغازگر UBC845 متغیر بود که بیانگر قدرت این آغازگرها در تفکیک موتانت‌ها است (شکل ٤).

درصد چند شکلی از ۱٤/۲۸درصد برای آغازگر 3A42 با کمترین درصد تا ۱۰۰ درصد برای آغازگر 3A07 با بیشترین درصد چند شکلی متغیر بود و میانگین میزان چندشکلی ٦۳/۰۸ درصد محاسبه شد (جدول ۳).



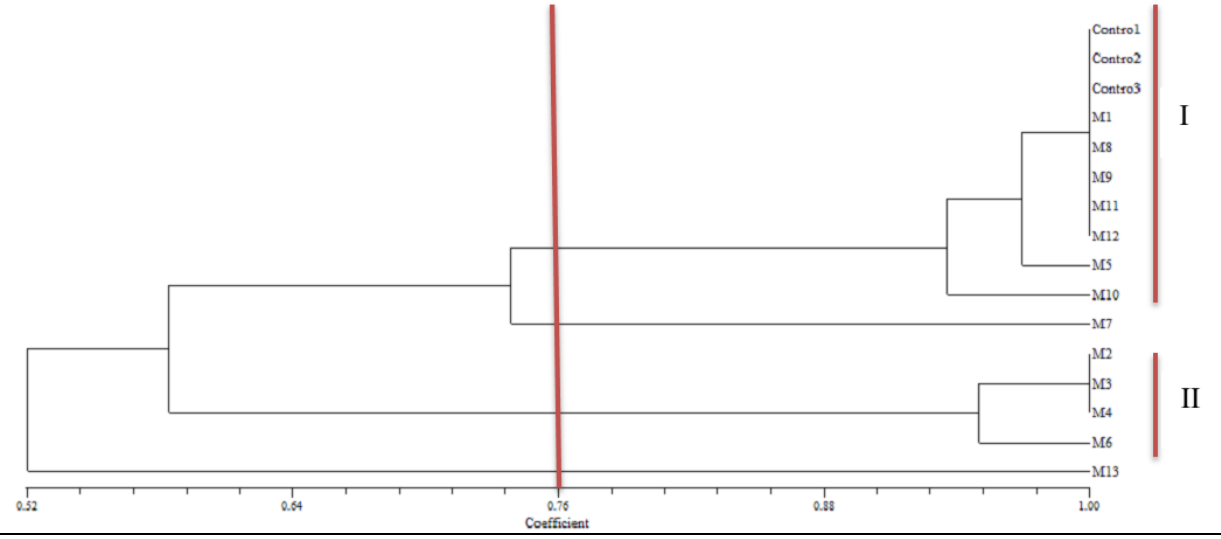
شکل ٤- الگوی نواری ISSR حاصل تکثیر موتانت‌های احتمالی لیلیوم با استفاده از آغازگرUBC845 . شماره ۱: نمونه شاهد؛ شماره ۲: سایز مارکر 100 plus؛ شماره ۳ تا ۷: نمونه‌های موتانت.

تجزیه خوشه‌ای بر اساس تمامی آغازگرها

باندهای چندشکل برای ترسیم دندروگرام بر اساس آنالیز خوشه‌بندی UPGMA استفاده شدند. شباهت ژنتیکی بین ژنوتیپ‌ها و شاهد با استفاده از ضریب جاکارد محاسبه گردید. سپس با استفاده از ماتریکس تشابه و الگوریتم تشابه بدست آمده، آنالیز خوشه‌بندی UPGMA صورت گرفت. گروه‌بندی موتانت‌های احتمالی و شاهد در دندروگرام، تمایز ژنتیکی ژنوتیپ‌های مورد مطالعه را نشان داد. در دندروگرام ۱۳ موتانت احتمالی و ۳ شاهد به ۲ گروه و ۲ فرد مجزا در سطح تشابه ژنتیکی ۰/۷٦ گروه‌بندی شدند (شکل ۵).

جدول ۳- نام و توالی آغازگر مورد استفاده و اطلاعات چندشکلی آن در رقم OT Yellow.

نام آغازگر	تعداد باندها	تعداد باندهای چند شکل	فراوانی باندهای چندشکل (٪)
3A01	۷	٤	٥٧/١٤
3A07	۸	۸	١٠٠
3A21	٦	٠	-
3A39	۷	٥	٧١/٤٢
3A42	۷	١	١٤/٢٨
3A62	۸	٥	٦٢/٥
UBC 824	۹	٦	٦٦/٦٦
UBC 873	۸	٦	٧٥
UBC 843	۷	٥	٧١/٤٢
UBC 853	٥	٤	۸٠
UBC 815	١٠	۸	۸٠
UBC 845	١٤	١١	٧٨/٥٧
مجموع	٩٦	٦٣	-



شکل ۵- دندروگرام بدست آمده از روش UPGMA و ضریب جاکارد برای ۱۳ موتانت احتمالی و شاهد لیلیوم. در این دندروگرام، ۳ نمونه شاهد، موتانت‌های احتمالی ۱، ۸، ۹، ۱۱، ۱۲، ۵ و ۱۰ گروه شماره ۱؛ موتانت‌های احتمالی ۲، ۳، ٤ و ٦، گروه شماره ۲ و موتانت‌های احتمالی ۷ و ۱۳ دو فرد مجزا هستند که در مجموع نشاندهنده ۲ گروه و ۲ فرد مجزا می‌باشند.

[Downloaded from flowerjournal.ir at 23:55 +0330 on Tuesday December 15th 2020]
[DOR: 20.1001.1.26765993.1397.3.1.3.0]

موتانت‌های احتمالی M1، M5، M8، M9، M10، M11، M12 و نمونه‌های شاهد در درون گروه I تقسیم‌بندی شدند. کمترین تغییرات ژنتیکی در گروه I مشاهده شد. از بین این موتانت های احتمالی، موتانت M1 و M5 مربوط به دُز تابشی ۲ گری، M8 و M9 متعلق به دُز تابشی ٦ گری و موتانت‌های M10، M11 و M12 مربوط به دُز تابشی ۱۰ گری می‌باشند. در گروه II موتانت‌های M2، M3، M4 و M6 قرار داشتند که موتانت‌های M2، M3 و M4 تحت تیمار تابشی ۲ گری و موتانت M6 تحت تیمار ٦ گری بود. موتانت‌های M7 (تیمار ٦ گری) و M13 (تیمار ۱۰ گری) در درون هیچ خوشه‌ای گروه‌بندی نشدند. این دو موتانت نسبت به بقیه موتانت‌ها دارای تشابه ژنتیکی کمتری هستند و تغییر ژنتیکی بیشتری نشان دادند.

عموماً جهت ارزیابی تنوع در موجودات و تفکیک ژنوتیپ-ها، از نشانگرها استفاده می‌شود. در بین این نشانگرها، نشانگر ISSR، تکنیکی مبتنی بر واکنش زنجیره‌ای پلیمراز است که از سال ۱۹۹٤ برای مطالعه ارقام مختلف گیاهان مورد استفاده قرار می‌گیرد (Guan *et al*. 2008). این نشانگر دارای تکرار پذیری بالا بوده و از مراحل ساده و کوتاهی برخوردار است. همچنین قادر است چند شکلی مطلوبی را در تجزیه و تحلیل روابط ژنتیکی ایجاد کند. در این تکنیک بعد از استخراج DNA ژنومی، قطعه مابین دو ناحیه تکراری ریزماهواره یکسان که دارای جهت گیری مخالف نسبت بهم بر روی ژنوم هستند بوسیله تک پرایمری ۲۵-۱٦ نوکلئوتیدی که بر اساس نواحی ریزماهواره طراحی شده‌اند، تکثیر می‌شود. محصولات تکثیری معمولا دارای طول ۲۰۰۰-۲۰۰ جفت باز هستند که می‌توان آن‌ها را بوسیله ژل آگارز یا پلی اکریل آمید نمایان ساخت و چند شکلی موجود در این نواحی را تشخیص داد (Reddy *et al*. 2002).

با توجه به نتایج بدست آمده از این تحقیق به نظر می‌رسد که تمامی تیمارها باعث تغییرات ژنتیکی شده‌اند. بدلیل کاربرد لایه‌های نازکی از فلس پیاز لیلیوم به عنوان ریزنمونه در این آزمایش و باززایی مستقیم نمونه‌ها، به نظر می‌رسد تنوع القا شده در موتانت‌های احتمالی، تنوع سوماکلونال نباشد به این دلیل که غالباً تنوع سوماکلونال ناشی از باززایی غیر مستقیم ریزنمونه‌ها و القای کالوس در آن‌ها می‌باشد. همچنین اگر فرض شود تنوع سوماکلونال بر اثر ترکیب هورمونی محیط کشت ایجاد شده است بایستی در برخی از نمونه‌های شاهد نیز حداقل مقداری تنوع مشاهده شود که در این پژوهش، نمونه‌های شاهد تنوعی را نشان ندادند. نتایج این تحقیق مشابه با نتایج القای موتاسیون با استفاده از پرتو گاما بر روی لیلیوم (Xi *et al*. 2012) و القای موتاسیون با پرتو گاما در گیاه داوودی بود (Barakat *et al*. 2010). بطوری‌که در تیمار نمونه‌های لیلیوم و داوودی با دُزهای مختلف پرتو گاما، تنوع ژنتیکی با استفاده از نشانگر ISSR مشخص شد که نشاندهنده قدرت پرتو گاما در ایجاد تنوع و بروز تغییرات ژنتیکی می‌باشد.

نتایج این تحقیق به عنوان مقدمه‌ای برای ادامه تحقیق بر روی خصوصیات مورفولوژیک موتانت‌های احتمالی گیاه لیلیوم ضروری است. همچنین استفاده از نشانگر می‌تواند روند تشخیص موتانت‌ها و تنوع القا شده را تسریع نماید. بررسی تغییرات مولکولی موتانت‌های لیلیوم حاصل از القای پرتو گاما در این تحقیق، نشان داد که تابش توانسته است از لحاظ ژنتیکی، چندشکلی نسبتاً بالایی در آن‌ها ایجاد کند. بطوری‌که هر سه سطح تیمار باعث تغییرات ژنتیکی شده و موتانت‌هایی با تمایز ژنتیکی ایجاد کردند. اما با توجه به اینکه تیمار ریزنمونه‌ها در سطوح بالاتر تابش (٦ و ۱۰ گری) کاهش باززایی نمونه‌ها را بهمراه داشت، بهترین سطح تیمار تابشی برای ریزنمونه‌های فلس گیاه لیلیوم در شرایط درون شیشه‌ای، دُز ۲ گری در نظر گرفته شد. ممکن است

[Downloaded from flowerjournal.ir at 23:55 +0330 on Tuesday December 15th 2020]
[DOR: 20.1001.1.26765993.1397.3.1.3.0]

هنگام استفاده از پرتو گاما، علاوه بر ایجاد تنوع مطلوب، موتانت‌های نامطلوب نیز بروز و ظهور یابند. یکی از مزایای مهم القای موتاسیون در کشت درون شیشه ای مشخص کردن همین صفات مطلوب و نامطلوب و گزینش از بین آن‌ها می‌باشد. به عبارتی با انتخاب در محیط درون شیشه‌ای سریعتر می‌توان به تنوع مفید القا شده و صفات مطلوب دسترسی پیدا کرد.

نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که نشانگر ISSR از قدرت تمایز خوبی به منظور تعیین تنوع ژنتیکی برخوردار می‌باشد. این نتایج نشاندهنده قدرت و کارایی موتاژن فیزیکی پرتو گاما در ایجاد تنوع ژنتیکی می‌باشد که دست به‌نژادگر را برای اعمال انتخاب در جهت بهبود واریته‌های گیاهی با خصوصیات مطلوب باز می‌گذارد.

دستورالعمل ترویجی

جهت القای تنوع و ایجاد جهش در گیاه لیلیوم:

۱- شکستن خواب پیاز لیلیوم با قرار دادن آن‌ها در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد و سپس ضدعفونی سطحی

۲- کشت ریزنمونه‌های TCL در محیط کشت حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر BA و ۰/۵میلی‌گرم در لیتر NAA.

۳- تیمار ریزنمونه‌ها با دُز تابشی ۲ گری و سپس واکشت ریزنمونه‌ها بلافاصله پس از تیمار در محیط کشت با ترکیب هورمونی مشابه

٤- واکشت ریزنمونه‌ها در محیط کشت مشابه به منظور رشد بیشتر به مدت ۲ ماه

۵- کشت شاخه‌های رشد یافته در محیط کشت MS ۱/۲ به منظور تولید ریشه به مدت یک ماه

٦- سازگاری گیاهچه‌ها در محیط حاوی کوکوپیت و پرلیت به نسبت ۱:۱

سپاسگزاری

نگارندگان مقاله از گروه بیوتکنولوژی گیاهان زینتی جهاد دانشگاهی مشهد جهت تامین اعتبار و امکانات لازم برای انجام این تحقیق کمال تشکر را دارند.

منابع

Afrasiab H (2006). Biochemical and molecular markers of somaclonal variants and induced mutants of potato. PhD thesis, Punjab University, India.

Bagheri N, Babaeian Jelodar N, Hasan Nataj E (2008) Genetic diversity if Iranian rice germplasm based on morphological traits. IJFCR. 6:235-243.

Barakat MN, Abdel Fattah RS, Badr M, El-Torky MG (2010). *In vitro* mutagenesis and identification of new variants via RAPD markers for improving *Chrysanthemum morifolium*. AJB. doi: 10.5897/AJAR09.679.

Brown DCW, Thorpe, TA (1995). Crop improvement through tissue culture. World J Microbiol Biotechnol. 11: 409-415.

Brunner H (1995). Radiation induced mutations for plant selection. Appl. Radiat-Isot. doi: 10.1016/0969-8043(95)00096-8.

Danesi PR (1992). Nuclear techniques and sustainable agricultural development. IAEA Bulletin 4.

Dita MA, Rispail N, Prats E, Rubiales D, Singh KB (2006). Biotechnology approaches to overcome biotic and

[Downloaded from flowerjournal.ir at 23:55 +0330 on Tuesday December 15th 2020]
[DOR: 20.1001.1.26765993.1397.3.1.3.0]

abiotic stress constraints in legumes. Euphytica. doi: 10.1007/s10681-006-6156-9.

Farjadi-shakib M, Naderi R, Mousavi A (2010). Effects of gamma-ray irradiation on African violet *in vitro* adventitious shoots. XXVIII International Horticultural Congress on Science and Horticulture for People.

Guan XJ, Xi L, Shao YC, Wang ZR, Chen FS, Luo XC (2008). Differentiation of commercial strains of Agaricus species in China with inter-simple sequence repeat marker. World J Microbiol Biotechnol. doi: 10.1007/s11274-007-9647-5.

Hasbullah NA, Taha RM, Saleh A, Mahmad N (2012). Physiological responses of callus from *Gerbera jamesonii* Bolus ex. Hook f. to gamma irradiation. Braz- Arch- Biol. technol. doi: 10.1590/S1516-89132012000300012.

Lu G, Zhang X, Zou Y, Zou Q, Xiang X, Cao J (2007). Effect of radiation on regeneration of Chinese narcissus and analysis of genetic variation with AFLP and RAPD markers. Plant Cell Tiss Organ Cult. dio: 10.1007/s11240-006-9189-9.

Maluszynski M, Nichterlein K, Van zanten L, Ahloowalia BS (2000). Officially Released Mutant Varieties. The FAO/IAEA Database. 12: 1-85.

Niks RE, Ellis PR, Parlivet, JE (1994). Resistance to parasites. In: Haywood, M.D., Bosemark, N.O. and Romagosa, I. (Eds.) Plant Breeding: Principles and Prospects. Chapman & Hall, London: pp. 422-448.

Phuong Thao NT, Ureshino K, Miyajima I, Ozaki Y, Okubo, H (2003). Induction of tetraploids in ornamental *Alocasia* through colchicine and oryzalin treatments. Plant Cell Tiss Organ Cult. doi: 10.1023/A:1021292928295.

Reddy MP, Sarla, N, Siddiq EA (2002). Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. Euyphytica. doi: 10.1023/A:1020691618797.

Xi M, Sun L, Qiu S, Liu J, Xu J, Shi J (2012). *In vitro* mutagenesis and identification of mutants via ISSR in lily (*Lilium longiflorum*). Plant Cell Rep. doi: 10.1007/s00299-011-1222-8.

[Downloaded from flowerjournal.ir at 23:55 +0330 on Tuesday December 15th 2020]

[DOR: 20.1001.1.26765993.1397.3.1.3.0]

Mutation induction in lilium (*Lilium longiflorum*) using gamma ray at *in vitro* conditions

Keykha Fatemeh[*1], Yazdi Mahboobeh[2], Sharifi Ahmad[1], Nemati Zahra[3], Khadem Azadeh[1, 2], Bagheri Abdolreza[2]

1. Department of Ornamental Plant Biotechnology, Iranian Academic Center for Education, Culture and Research, Branch of Mashhad, Mashhad, Iran.
2. Department of Plant Breeding and Biotechnology, College of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.
3. Department of Horticultural Science and Landscape, College of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.

* keykhafatemeh@yahoo.com

Abstract

Breeding and production of new varieties of ornamental plants as well as their propagation and developing are an expanding industry. Researches find it necessary to increase the genetic variation in Lilium, because of value of this ornamental plant as the fourth cut flower in the world. The present study was carried out to investigate gamma radiation effects on *in vitro* mutation induction in Lilium. ISSR markers were used to determine genetic variation in resulting explants. Thin cell layer (TCL) explants were treated with 2, 6 and 10 Gy of gamma rays. Treated explants were cultured in MS medium supplemented with 1 mg/l BA and 0.5 mg/l NAA. Results showed all treatments induced genetic diversity, but the optimal dose was 2 Gy, because of increase diversity and survival rate of explants. The results confirmed the efficiency of ISSR markers for detection of genetic variations. Furthermore, the results suggested that mutatants induced by gamma irradiation are not only as a source for genetic variations but also as a useful tool for early selection of desirable mutants by breeders.

Keywords: Gamma ray, *Lilium*, Mutation, Molecular Marker, ISSR.

[Downloaded from flowerjournal.ir at 23:55 +0330 on Tuesday December 15th 2020]

[Downloaded from flowerjournal.ir at 23:55 +0330 on Tuesday December 15th 2020]

[DOR: 20.1001.1.26765993.1397.3.1.3.0]