مطالعه ناهنجاری‌های میتوزی تحت دزهای مختلف اشعه گاما در گیاه باقلا

سمیه نصراللهی[1*]، محمدرضا سیاهپوش[2]، رضا سخاوت[3]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد اصلاح نباتات، دانشگاه شهید چمران، اهواز. ۲- استاد گروه زراعت و اصلاح، دانشگاه شهید چمران، اهواز. ۳- عضو هیئت علمی مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی صفی آباد، دزفول.

*نویسنده مسئول: somayenasrollahi@yahoo.com

چکیده

به منظور شناخت اثرات دزهای مختلف اشعه گاما (۲۵، ۳۵، ۴۵، ۵۵ گری و دز صفر به عنوان شاهد) بر روی ناهنجاری‌های میتوزی در نسل M_2 در گیاه باقلا رقم سرازیری، آزمایشی در آزمایشگاه سیتوژنتیک گروه زراعت و اصلاح نباتات دانشکده‌ی کشاورزی دانشگاه شهید چمران اهواز در سال ۹۴-۱۳۹۳ انجام پذیرفت. در این آزمایش انواع مختلفی از ناهنجاری‌های میتوزی از جمله کروموزوم‌های سرگردان، پل آنافازی و تلوفازی، آنافاز مختل شده، قطعات کروموزومی، چسبندگی کروموزوم‌ها، ریزهسته-ها و غیره مشاهده شد. با افزایش دز پوتوتابی از ۲۵ به ۵۵ گری، میزان ناهنجاری‌های ذکر شده افزایش یافت. پل‌های کروموزومی در مرحله آنافاز به تعداد بیشتری نسبت به مرحله تلوفاز مشاهده گردید که با افزایش دز اشعه تعداد این ناهنجاری نیز افزایش یافت به طوری که کمترین پل کروموزومی در شاهد و بیشترین آن در دز ۵۵ گری مشاهده گردید. ناهنجاری میکرونکلئوس در این مطالعه طی مرحله تلوفاز نسبت به سایر ناهنجاری‌ها و همچنین در دزهای بالاتر، بیشترین مشاهده را داشت.

کلمات کلیدی: اشعه گاما، باقلا، کروموزوم سرگردان، ریزهسته

مقدمه

Vicia faba معمولا به عنوان faba bean یا broad bean شناخته شده و یک محصول زراعی مهم می‌باشد. باقلا به خانواده بقولات تعلق دارد و تعداد کروموزوم‌های دیپلوئید آن (۲n=۱۲) است. باقلا یک غذای مشترک برای بسیاری از تمدن‌های مدیترانه و خاور نزدیک از جمله مصری‌ها، یونانی‌ها و رومی‌ها است (Khursheed & Khan, 2014). واژه جهش از کلمه لاتین mutation به معنی تغییر عمده، اساسی و ناگهانی مشتق شده است. موتاسیون یک تغییر قابل وراثت است که بر کروموزوم اثر دائم گذاشته و منجر به ایجاد یک موجود جهش یافته یا موتانت می‌شود (موسوی شلمانی و همکاران ۱۳۸۸). موتاژن‌ها به طور کلی به دو دسته فیزیکی و شیمیایی تقسیم می‌شوند. اشعه گاما یکی از موتاژن‌های فیزیکی اصلی برای مطالعات موتاسیونی در گیاهان است (Melki & Dahmani, 2009). پرتوهای گاما دارای طول موج کوتاه، فرکانس و انرژی بسیار زیاد هستند و به راحتی در بافت موجودات زنده نفوذ می‌کنند (شجاعی و همکاران ۱۳۸۹). اشعه گاما می‌تواند اثرات مفید و مضری بر روی کروموزوم در گیاهان زراعی القا کند (Melki & Dahmani, 2009). برخی اثرات موتاژن به شکل سیتولوژیکی قابل مشاهده است. جهش‌های کروموزومی و ناهنجاری‌ها در تقسیم میتوز و میوز از اثرات موتاژن‌هاست (موسوی شلمانی و همکاران ۱۳۸۸). یکی از ساده ترین و ارزان ترین روش‌ها برای مطالعه ناهنجاری‌های کروموزومی به کار بردن رأس ریشه گیاه به عنوان ماده آزمایشی است (Kihlman, 1975). کروموزوم‌های سلول های انتهای ریشه باقلا به دلیل سهولت دسترسی به آنها، اندازه بزرگ، تعداد کم در هر دسته و خصوصیات قابل تشخیص، به طور وسیعی برای هدف‌های پژوهشی از جمله مطالعات ناهنجاری‌های کروموزومی مناسب هستند (Asthana & Kumar, 2014). مقاله حاضر با هدف بررسی ناهنجاری‌های میتوزی تحت تأثیر دُزهای مختلف اشعه گاما در گیاه باقلا انجام شد.

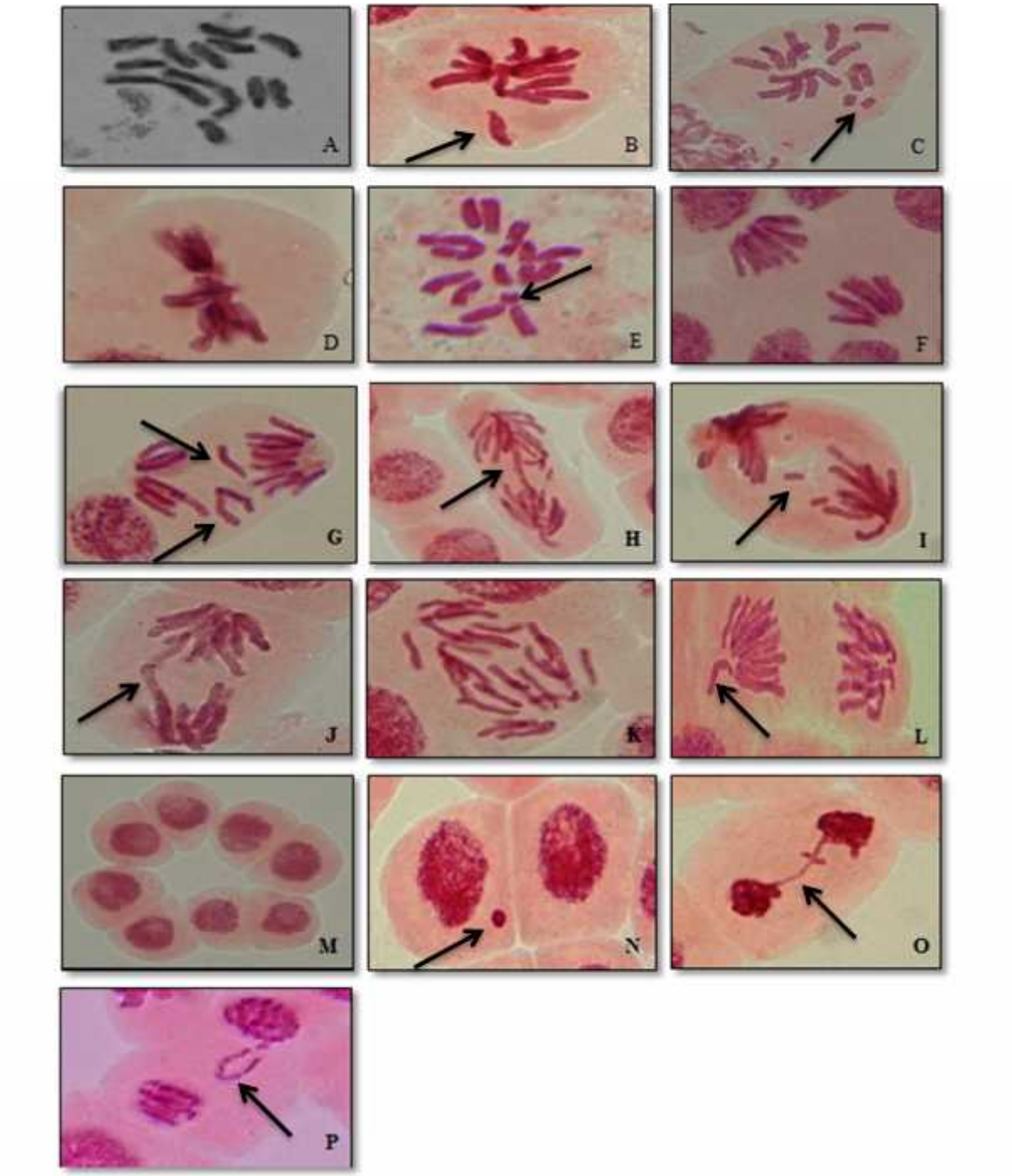
مواد و روش‌ها

ابتدا بذور تشعشع یافته با دُزهای مختلف اشعه گاما (۲۵، ۳۵، ۴۵، ۵۵ گری و دز صفر به عنوان شاهد) حاصل از نسل M_1 در آب مقطر به مدت ۲۴ ساعت خیسانده و سپس در محیط کشت کوکوپیت کاشته شدند. لازم به توضیح است که تشعشع بذور در پژوهشکده کشاورزی سازمان انرژی اتمی انجام شد. پس از تهیه مریستم‌های نوک ریشه به طول ۳-۲، ریشه‌ها با آب ویخ به مدت ۲۴ ساعت در درون یخچال در دمای ۴ درجه سانتیگراد پیش تیمار شدند. سپس نمونه‌های ریشه در محلول تازه کارنوی (اتانول و گلاسیال استیک اسید به نسبت ۳:۱) به مدت ۲۴ ساعت در شرایط یخچال در دمای ۴ درجه سانتیگراد تثبیت شدند. بعد از شستشو با آب مقطر هیدرولیز با محلول HCL یک نرمال به مدت ۲۵ دقیقه در آون ۶۰ درجه سانتیگراد صورت گرفت. پس از پایان این مدت ریشه‌چه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه با آب مقطر شستشو داده شدند. پس از مرحله هیدرولیز، ریشه‌چه‌ها با استفاده از محلول استوکارمن ۱٪ به مدت ۳-۲ ساعت رنگ آمیزی شدند. در مرحله اسکواش برای تهیه نمونه، یک قطره محلول سوسپانسیون اسید استیک ۴۵٪ روی لام ریخته سپس با گذاشتن لامل بر روی سلول‌ها و حرارت دادن ملایم همراه با فشار ملایم انگشت شصت، عمل اسکواش (له کردن) سلول‌ها صورت گرفت و نهایتاً اسلایدهای تهیه شده با عدسی ۴۰x در زیر میکروسکوپ نوری Olympus (مدل BH_2، ساخت ژاپن) جهت شناسایی ناهنجاری‌ها مورد مطالعه قرار گرفتند. سلول‌های مریستم نوک ریشه در مراحل مختلف تقسیمات میتوز جهت شناسایی ناهنجاری‌ها مورد بررسی قرا گرفتند. عکس برداری از کروموزوم‌ها با استفاده از دوربین Olympusمدل DP_{12} با بزرگنمایی۱۰۰X انجام شد.

نتایج و بحث

دزهای مختلف اشعه گاما باعث ایجاد ناهنجاری‌های مختلف میتوزی از جمله چسبندگی‌ها، شکستگی کروموزوم، جدایی اولیه کروموزوم، قطعات، کروموزوم‌های سرگردان (Laggard)، پل‌ها، آنافاز مختل شده، کروموزوم‌های در به در (Vagrand) و ریز هسته‌ها در سلول‌های نوک ریشه گیاه باقلا گردید. در این مطالعه چسبندگی کروموزوم‌ها در مرحله متافاز در تمام تیمارها مشاهده گردید. با فزایش دز اشعه گاما چسبندگی کروموزوم‌ها نیز افزایش یافت به طوری که کمترین و بیشترین چسبندگی به ترتیب در شاهد و دز ۵۵ گری مشاهده شد البته در مورد این ناهنجاری تفاوت چندانی بین دزهای مختلف اشعه گاما مشاهده نشد (شکل۱. D). چسبندگی کروموزوم‌ها به یکدیگر از ایجاد انتهای چسبناک بین دو یا چند کروموزوم ناشی می شود. چسبندگی معمولا منجر به تشکیل پل‌های آنافازی و تلوفازی می شود (Souza et al., 2006 ; Ranjbar et al., 2009). عوامل ژنتیکی و محیطی به عنوان عامل چسبندگی در نظر گرفته می شوند (Caetano-Pereira et al., 1995). بر اساس نتایج حاصل پل‌های کروموزومی به ترتیب در مراحل آنافاز و تلوفاز مشاهده شدند. تعداد این ناهنجاری در مرحله آنافاز با افزایش دز اشعه گاما افزایش پیدا کرد به طوری که در دز ۵۵ گری بیشترین مشاهده را داشت. اما پل‌های کروموزومی در مرحله تلوفاز به تعداد کمتری و فقط در دزهای ۴۵،۳۵ و ۵۵ گری مشاهده شد (شکل ۱. J و O). همچنین در مطالعه حاضر، در برخی سلول‌ها، پل به همراه قطعات کروموزومی در مرحله آنافاز مشاهده گردید (شکل۱. H). پل‌های کروموزومی ممکن است به دلیل چسبندگی‌های کروموزومی و پس از آن ناتوانی در تفرق آنافازی باشد، یا ممکن است به انتقال نابرابر یا به منشاء قطعات کروموزومی نسبت داده شود (Bhat et al 2007). کروموزوم‌های سرگردان در این مطالعه در طی مراحل آنافاز و تلوفاز مشاهده گردید. کروموزوم‌های سرگردان در مرحله آنافاز در تمام تیمارها با افزایش دز اشعه گاما افزایش یافت ولی در مرحله تلوفاز این ناهنجاری فقط در دز ۵۵ گری مشاهده شد (شکل ۱. G و P). کروموزوم‌های سرگردان، کروموزوم‌هایی هستند که از تفکیک آنافازی عقب مانده اند. سرگردانی کروموزوم‌ها به علت عدم

اتصال صحیح کروموزوم‌ها به رشته دوک و عدم انتقال آنها به قطبین است. کروموزوم‌های سرگردان در صورتی که نتوانند در زمانی که باید در هسته تلوفاز باشند به قطب‌ها برسند، می‌توانند تولید میکرونوکلئوس کنند (Souza et al., 2006).



شکل ۱- ناهنجاری‌های کروموزومی در گیاه باقلا. A) متافاز شاهد؛ B) کروموزوم جدا افتاده در متافاز؛ C) قطعات کروموزومی در متافاز؛ D) چسبندگی کروموزوم‌ها در متافاز؛ E) شکستگی کروموزوم‌ها در متافاز؛ F) آنافاز شاهد؛ G) کروموزوم‌های تنبل در آنافاز؛ H) پل و قطعات کروموزومی در آنافاز؛ I) قطعات کروموزومی در آنافاز؛ J) پل آنافازی؛ K) اختلال در آنافاز؛ L) کروموزوم در به در، در آنافاز؛ M) تلوفاز شاهد؛ N) میکرونوکلئوس در تلوفاز؛ O) پل تلوفازی؛ P) کروموزوم تنبل در تلوفاز

در بررسی تأثیر گرمای آخر فصل بر روی ناهنجاری‌های میوزی در سلول‌های مادری گرده در گیاه گندم مشخص شد که دمای بالا باعث ایجاد یکسری ناهنجاری کروموزومی ازجمله کروموزوم‌های سرگردان، ریزهسته، حرکت زودهنگام کروموزوم‌ها به قطب و غیره می‌شود (Omidi et al., 2014). ناهنجاری دیگر مشاهده شده در مطالعه حاضر، قطعات کروموزومی بود که در طی مراحل متافاز و آنافاز مشاهده شدند (شکل ۱. C و I). قطعات در متافاز ممکن است ناشی از واماندگی کروموزوم‌های شکسته شده در پیوستن دوباره باشد (Girija et al., 2013). کروموزوم‌های در به در از جمله ناهنجاری‌های مشاهده شده در این مطالعه بود که در طی مرحله آنافاز و فقط در برخی از دزهای اشعه با تعداد کمی مشاهده گردید (شکل ۱. L). منشاء ریز هسته‌ها کروموزوم‌های پیشتاز در مرحله متافاز و کروموزوم‌های به جای مانده در مرحله آنافاز می‌باشد (Kuduru & Rao, 1981). میکرونکلئوس در مطالعه حاضر، در طی مرحله تلوفاز مشاهده شد ودر بین ناهنجاری‌های موجود بیشترین مشاهده را به خود اختصاص داد. تعداد میکرونکلئوس‌ها با افزایش دز اشعه گاما افزایش یافت به طوری که در دز ۵۵ گری بیشترین مشاهده را داشت (شکل ۱. N). در آزمایش حاضر دزهای مختلف اشعه گاما باعث ناهنجاری‌های مختلفی در طی مراحل تقسیم میتوز شد که این ناهنجاری‌ها در دزهای بالاتر نسبت به دزهای پایین‌تر اشعه بیشتر مشاهده شد. بیشترین ناهنجاری‌ها هم از لحاظ تنوع و هم از لحاظ تعداد مربوط به مرحله آنافاز بود.

منابع

۱. شجاعی، ب.، احسانپور، ع. و عبدی، م. ۱۳۸۹. اثرات پرتو تابش پرتو گاما بر رشد، مقدار پروتئین، قدرت زیست و آسیبهای DNA در سلول‌های کالوس سیب زمینی. مجله زیست شناسی ایران. جلد ۱۷، شماره ۱: ۱۲۵-۱۳۱.

۲. موسوی شلمانی، م.، ناصریان خیابانی، ب.، اهری مصطفوی، ح.، حیدری، م. و مجد آبادی، ع. ۱۳۸۸. کشاورزی هسته ای (از علم تا عمل). ۱-۱۴۵.

3. Asthana. M. and Kumar, A. 2014. Dose response of *Viola odorata*on Meiotic andMitotic Chromosomes of *Viciafaba*. British Journal of Pharmaceutical Research. 4: 520-530.
4. Bhat. T., Parveen, S. and Khan, A. 2007. Meiotic studies in two varieties of viciafaba L. after EMS treatment. Asian Journal of Plant Sciences. 6:51-55.
5. Caetano-Pereira. CM., Pagliarini, MS., Brasil, EM. and Martins EN. 1995. Influence of aluminum in causing chromosome stickiness in maize microsporocytes. Maydica., 40: 325-330.
6. Girija. M., Gnanamurthy, S. and Dhanavel, D. 2013. Cytogenetics effect of gamma rays on root meristem cells of vignaunguiculata (L.). European Journal Of Experimental Biology. 2: 38-41.
7. Khursheed. SH. and Khan, S. 2014. Cytology of morphological mutants of viciafaba L. Var. vikrant. Annual Research & Review in Biology. 5: 1-6.
8. Kihlman. B.A. 1975. Root tips of *vicia faba* for the study of the induction of chromosomal aberrations. Mutation Research. 401-412.
9. Kuduru. P.R.K. and Rao, M. K. 1981. Cytogenetics of synaptic mutants in higher plants. Theoretical and Applied Genetics. 59:197-214.
10. Melki. M. and Th. Dahmani. 2009. Gamma irradiation effects on durum wheat (*Triticumaestivum*Desf.) under various conditions. Pakis. J. Biol. Sci. 23: 1531-1534.
11. Omidi. M., Siahpoosh, M.R., Mamghani, R. and Modarresi, M. 2014. The influence of terminal heat stress on meiosis abnormalities in pollen mother cells of wheat. Cytologia. 79: 49-58.
12. Ranjbar. M., Karamian, R. and Hadadi, A. 2009. Biosystematic study of Onobrychis vici folia Scop and Onobrychis altissima Grossh. (Fabaceae) in Iran. Iranian Journal of Botany. 15: 85-95.
13. Souza. M. M., Martins, E. R., Pereira, T. N. S. and Olivera, L. O. 2006 Reproductive studies on Ipecac (Cephalis ipecacuanha (Brot.) A. Rich, Rubiaceae): Meiotic behavior and pollen viability. Brazilian Journal of Biology. 66(1A): 151-159.

Studying the mitotic abnormalities under different doses of gamma radiation in *Vicia faba*

S. Narollahi[1*], M. R. Siahpoosh[2], R. Sekhavat[3]

1-M.Sc of Plant Breeding Science, Shahid Chamran University of Ahvaz. 2- Associate Professor, Dep. of Agronomy and Plant Breeding, Shahid Chamran University of Ahvaz. 3- Faculty member of Safi Abad Agricultural Recerch Center of Dezful.

*Corresponding aurhor: somayenasrollahi@yahoo.com

Abstract

In order to study the effects of different doses of gamma radiation (25, 35, 45, 55 Gry dose of zero as a control) on mitotic abnormalities in M2 generation of *vicia faba* Cult. Saraziri, an experiment was conducted in cytogenetic laboratory group of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Shahid Chamran University of Ahvaz. In this experiment a variety of mitotic abnormalities including laggard chromosomes, anaphase and telophase bridges, disturbed anaphase, chromosomal fragments, stickiness in chromosomes, micronucleus and etc were detected. The mitotic abnormalities frequented in high gamma radiation doses. In compare to telophase, the anaphase bridge reasonably increased when radiation doses raised to 55 Gray. The least abnormalities were observed in control. The micronucleus as an irregularity in mitosis was mainly appeared in telophase and in high doses.

Key words: Gamma radiation, *Vicia faba*, Laggard chromosome, Micronucleus