تاثیر جهش‌زاهای شیمیایی بر برخی ویژگی های مورفولوژیکی گیاهان پرآوری شده از ریزنمونه های جوانه جانبی و برگ در سه ژنوتیپ رز (*Rosa hybrida* L.)

مهدیه حقیقت افشار[*1]، احمد خلیقی[2]، مریم جعفرخانی کرمانی[3]، ابوالقاسم محمدی [4]و علی اکبر حبشی[3]

[*1] گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاد واحد تبریز، تبریز

[2] گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی دانشگاه آزاد واحد علوم و تحقیقات، تهران

[3] گروه کشت بافت و انتقال ژن، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران (*ABRII*)، کرج

[4]گروه بهنژادی و بیوتکنولوژی ، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز

mhafshar@iaut.ac.ir[*]

چکیده

در این پژوهش به منظور یافتن LD_{50}، ریزنمونه های گره و برگ که باززایی مستقیم ریزنمونه برگ قبلا بهینه سازی شده بود، تحت تاثیر دزهای متفاوت دو ماده جهش زا یعنی سدیم آزاید (SA) و اتیل متان سولفات (EMS) قرار گرفتند. در گیاهان حاصل از ریزنمونه گره که تحت تیمار LD_{50} سدیم آزاید قرار گرفته بودند، افزایش معنی داری در تعداد شاخساره، طول ساقه و اندازه میانگره نسبت به شاهد مشاهده شد. دز کشنده EMS روی ریزنمونه برگ رقم Maroussia سبب افزایش طول و عرض گل و تعداد گلبرگها و سبب کاهش بدفرمی گل در گیاهان باززا شده گردید. ارزیابی مولکولی تمام گیاهان هر سه ژنوتیپ با ۹ آغازگر ISSR انجام شد. تجزیه با استفاده از الگوریتم UPGMA و ضریب شباهت جاکارد، توانست گیاهان جهش یافته و شاهد را در دو گروه متفاوت دسته بندی کند. فاصله ژنتیکی قابل توجهی بین گیاهان جهش یافته و شاهد مشاهده گردید. بیشترین ضریب تبیین تصحیح شده (۰/۹۱) مربوط به صفت طول ساقه بود.

کلمات کلیدی: سدیم آزاید، اتیل متان سولفات، باززایی مستقیم، دز کشنده (LD_{50})، ISSR

مقدمه

اهداف بهنژادی در رز شامل تغییر رنگ، شکل، افزایش جذابیت گل، افزایش عمر گلدانی و کاربرد به عنوان گل شاخه بریده و کشت در فضای سبز می باشند (Kumar,2006). برنامه‌های بهنژادی رز، شامل ایجاد جهش در شرایط درون شیشه‌ای برای افزایش تنوع در ارقام تجارتی و نیز به دست آوردن اطلاعاتی در مورد پتانسیل ایجاد یک نوع جدید به صورت اتفاقی از واریته مورد آزمایش از روش های بهنژادی می‌باشند (Walther and Sauer, 1986). یکی از مزایای EMS این است که در جمعیت‌های نسبتاً کوچک، محدوده گسترده‌ای از آلل‌ها را می‌تواند تحت تأثیر قرار داده و جهش یافته‌های زیادی را در هر لاین ایجاد کند(Emmanuel and levy,2002). Nonomura و همکاران (۲۰۰۱) جوانه های انتهایی رشد یافته رز در شرایط درون شیشه ای را تحت تاثیر چند جهش زای شیمیایی قرار دادند. برطبق نتایج آنان تفاوت در اندازه، شکل، رنگ و تعداد گلبرگ در گیاهانی که با MNNG (N-متیلN- نیتروN-نیتروزوگوانیدین) با غلظت ۱۰۰ میکرو گرم در میلی لیتر تیمار شده بودند ملاحظه گردید. تکنیک ISSR-PCR روشی ساده، سریع و ارزان برای ارزیابی تنوع ژنتیکی ، شناسایی ارقام خویشاوند، مطالعه ثبات ژنتیکی در شرایط درون شیشه ای، تعیین جنسیت گیاه و شناسایی گونه ها می باشد.

موادوروش‌ها

سه ژنوتیپ تجاری *Rosa hybrida* با نام های Apollo,Dolce Vitaو Maroussia از کلکسیون ژرم پلاسم رز پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران(*ABRII*) تهیه گردید. برای اعمال دز کشنده روی ریزنمونه جوانه جانبی، ابتدا ساقه های یک تا یک ونیم سانتی متری از هر سه ژنوتیپ در محیط کشت ساقه زایی(وندر سالم به اضافه یک میکرو مولار بنزیل آمینو پورین) کشت شدند. بعد از چهار هفته ۲۰۰ جوانه جانبی برای هرژنوتیپ در ۲۰ تکرار(شیشه مربایی) در هر تکرار ۱۰

IrHC2019

جوانه جانبی، برای اعمال دز کشنده هر یک از مواد جهش زای EMS(ژنوتیپ Apollo ، ۱۰۰ میلی مولار، ژنوتیپ Dolce Vita ، ۵۰ میلی مولار و ژنوتیپ Maroussia ،۷۵ میلی مولار به مدت ۶۰ دقیقه) و SA(ژنوتیپ Apollo ، ۳۰ میلی مولار، ژنوتیپ Dolce Vita ، ۱۵ میلی مولار و ژنوتیپMaroussia ،۲۰ میلی مولار به مدت ۶۰ دقیقه) آماده شدند و تحت تیمار قرار گرفتند. سپس جوانه های جانبی پرآوری شده بعد از چهار هفته جدا شده و در محیط کشت جدید کشت شدند. گیاهچه های حاصل بعد از ۸ هفته در محیط ریشه زایی ریشه دادند. برای اعمال دز کشنده روی ریزنمونه برگ کامل، نیز به صورت فوق گیاهان کشت شدند و بعد از چهار هفته ۲۰۰ عدد برگ کامل برای اعمال دز کشنده با مواد جهش زا(SA(یک میلی مولار) و EMS(۴۰ میلی مولار) تهیه شده و تحت دز کشنده قرار گرفتند. ریزنمونه های برگ بعد از چهار هفته ماندن در محیط انگیزش به محیط باززایی منتقل شدند. گیاهچه های باززا شده به محیط ساقه زایی منتقل شدند و بعد از چهار هفته در محیط ریشه زایی ریشه دار شدند. خصوصیات مورفولوژیکی شامل ارتفاع بوته، تعداد جوانه جانبی ، اندازه میانگره، تعداد شاخساره های جانبی، تعداد پرچم، تعداد کاسبرگ، تعداد گلبرگ، تغییرات رنگ و فرم گل، عرض گل، طول گل و نسبت طول به عرض گل، ۳ و ۶ ماه بعد از انتقال گیاهان به گلخانه ثبت گردید. داده ها با استفاده از نرم افزارهای SAS،MSTAT-Cو SPSS تجزیه شدند. جهت استخراج DNA از برگ گیاهان شاهد و تیمار شده، نمونه ها طبق پروتکل Barzegari et al.,2010 بر اساس روش CTAB آماده شدند. در این تحقیق از ۱۳ آغازگرISSR استفاده شد. ۹ آغازگر با الگوی نواری مناسب و چند شکل برای ارزیابی افراد مورد مطالعه انتخاب شدند. حضور و عدم حضور نوارها به صورت یک یا صفر امتیازدهی شد. گروه بندی ژنوتیپ ها با استفاده از الگوریتم UPGMA و ضریب تشابه جاکارد (Jaccard, 1908) با استفاده از نرم افزار NTSYS انجام شد. برای انجام تجزیه های آماری از نرم افزار(Gen Alex V.6.2) استفاده شد و تجزیه مولکولی(AMOVA) انجام شد جهت یافتن همبستگی بین صفات مورفولوژیکی و باندهای تولید شده از تجزیه رگرسیون چند متغیره در برنامه SPSS استفاده شد.

نتایج وبحث

نتایج نشان داد تیمار با مواد جهش زا میانگین پرآوری جوانه های جانبی را به طور معنادار کاهش داد. مقایسه میانگین داده ها نشان داد که اعمال دزهای کشنده SA و EMS به طور معنادار درصد ریشه زایی را کاهش داد. تعداد ریشه در تیمار با این دو ماده به طور معنی داری کمتر از تیمارهای شاهد بود و تعداد ریشه در تیمار با EMS به طور معنادار کمتر از گیاهان تیمار شده با SA بود. این نتایج با نتایج (Bala and Palsingh,2015) مطابقت داشت. تعداد شاخساره های باززا شده از ریز نمونه برگ ژنوتیپ Maroussiaدر تیمار با دزهای کشنده SA و EMS به طور معناداری کمتر از شاهد بود. مقایسه میانگین داده ها نشان داد که تعداد ریشه گیاهچه های حاصل از باززایی ریزنمونه های برگ کامل تیمار شده با EMS به طور معناداری بیشتر از ریشه های گیاهچه های حاصل از تیمار برگ های کامل با SA و گیاهچه های شاهد بود. در تیمار جوانه های جانبی ژنوتیپ Maroussia با SA و EMS برخلاف نتیجه تیمارها روی ریزنمونه برگ کامل، تعداد ریشه گیاهچه های حاصل از پرآوری جوانه های جانبی کمتر از شاهد بود، ولی درصد ریشه زایی همانند این آزمایش در تیمار با EMS به طور معنی داری بیشتر از تیمار SA بود و تفاوتی با شاهد نداشت. تعداد شاخساره، طول ساقه و اندازه میانگره در تیمار SA به طور معنی داری بیشتر از EMS و شاهد بود. این نتیجه با گزارش Ganesan *et al.*(2005) یعنی افزایش تعداد و طول ریشه در گیاهان پنبه که رویان های آنها تحت تیمار ۱۰ میلی مولار SA قرار گرفته بود نسبت به گیاهان شاهد مطابقت دارد (جدول ۱). SA همچنین سبب تغییر رنگ گل در ژنوتیپ Apolloاز قرمز به صورتی، افزایش تعداد گلبرگ در ژنوتیپ Dolce Vita، کاهش بدفرمی گل، افزایش شاخه های قوی رشد و افزایش تعداد گلبرگ در ژنوتیپ Maroussiaگردید. کهریزی (۱۳۸۹) با کاربرد دزهای کشنده اشعه گاما بر جوانه های جانبی پنج ژنوتیپ رز تغییراتی در شکل و اندازه برگ، تغییرات در شکل و رنگ گل مشاهده کرد. همچنین در ژنوتیپ Apollo یک جهش یافته با رنگ صورتی و تغییر در فرم گل و گلبرگ و افزایش تعداد گلبرگ ها در مقایسه با شاهد را گزارش نمود. در تحقیق حاضر نیز کاربرد دز کشنده SA در ژنوتیپ Apollo سبب افزایش درصد تغییر رنگ از قرمز به صورتی پررنگ، گرد شدن لبه گلبرگ ها شد، ولی تعداد گلبرگ ها تغییری نسبت به گیاهان شاهد نداشت. در گیاهان حاصل از باززایی مستقیم برگ در ژنوتیپ Maroussia دز کشنده EMS سبب افزایش عرض و طول گل، افزایش تعداد گلبرگ و کاهش تغییر شکل گل در گیاهان حاصل از باززایی برگ این ژنوتیپ گردید. (شکل ۱).

IrHC2019

جدول ۱-تجزیه واریانس تاثیر تیمار با مواد جهش زا روی صفات رویشی گیاهان حاصل از جوانه جانبی سه رقم بعد از شش ماه انتقال به گلخانه.

منبع تغییرات	درجه آزادی	تعداد شاخساره جانبی	تعداد گره	طول ساقه	طول میانگره
تیمار	۲	۸۸/۴۰**	۲۱/۴۳^{ns}	۷۳۱/۶۶**	۶/۸۶**
رقم	۲	۶/۵۰**	۲۲/۶۷^{ns}	۹۲/۹۵**	۰/۶۵*
تیمار در رقم	۳	۲۰/۵۱**	۷۳/۴۷**	۲۳۴/۷۱**	۱/۷۳**
خطا	۱۶۱	۱/۳۰	۹/۱۳	۱۶/۰۹	۰/۱۶
CV%	-	۴۱/۸۴	۲۹/۱۳	۴۱/۲۵	۴۲/۰۸

شکل ۱- ژنوتیپ Maroussia . الف .گل شاهد ب. ایجاد گل خوشفرم و بزرگ در تیمار با EMS ج. ایجاد گل خوشفرم با ۷۵ عدد گلبرگ در مقایسه با ۵۶ عدد گلبرگ گیاهان شاهد، در تیمار با EMS جوانه های جانبی.

تجزیه مولکولی نشان داد تفاوت بین ژنوتیپ های شاهد و تیمارشده بیشتر از تفاوت درون هر یک از گروه های شاهد و تیمار شده بود. گروه بندی ژنوتیپ ها با الگوریتم UPGMA و ضریب شباهت جاکارد گیاهان تیمار شده و شاهد را در تیمار EMS ژنوتیپ Apollo، تیمار SA ژنوتیپ Dolce Vita ، تیمارهای SA و EMS ژنوتیپ Maroussia حاصل از ریزنمونه جوانه جانبی و تیمار SA ژنوتیپ Maroussia حاصل از ریزنمونه برگ کامل را در دو گروه کاملا جدا از هم گروه بندی کرد. تجزیه مولکولی و تعیین فاصله ژنتیکی نیز این نتیجه را تایید کرد. بیشترین فاصله ژنتیکی (۷۴) بین گیاهان شاهد و تیمار شده با EMS ژنوتیپ Apollo و کمترین فاصله ژنتیکی (۴۶/۷۲) بین گیاهان شاهد و تیمار شده با EMS ژنوتیپ Maroussia حاصل از ریزنمونه برگ کامل بود. Xi و همکاران (۲۰۱۲)، با استفاده از نشانگر ISSR تفاوت ژنتیکی ۳۶/۰۶٪ را بین گیاهان حاصل از فلس های سوخ لیلیوم تیمار شده با Gy۱ اشعه گاما و گیاهان شاهد گزارش کردند. آنها همچنین از ۵۰ لاین جهش یافته، ۹ لاین که از نظر مورفولوژی نیز با گیاهان شاهد متفاوت بودند، پیدا کردند. Senapati وRout (۲۰۱۱) ، ۲۸ گیاه جهش یافته را در رز ژنوتیپ First red که با ماده جهش زای ارزالین تیمار شده بودند با استفاده از نشانگر RAPD شناسایی کردند. در مجموع ۳۰۴ نشانگر مثبت مرتبط با صفات مورفولوژیکی شناسایی شد که می تواند در برنامه های اصلاحی رز به کار رود. بیشترین ضریب تبیین تصحیح شده مربوط به صفت طول ساقه بود.

منابع

آقچه کهریزی زهرا. ۱۳۸۹. ایجاد ژنوتیپ‌های جدید رز با استفاده از پرتوتابی اشعه گاما در شرایط این ویترو. پایان نامه کارشناسی ارشد. دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی. دانشگاه زنجان.

Kumar N. 2006. Breeding of Horticultural crops principals and practices. ISBN 81-89422-04-9. Shiva Mkt.,Pitam Pura, New Delhi.

IrHC2019

Walther F. and A.Sauer.1986.Analysis of radio sensitivity: A basic requirement for *in vitro* somatic mutagenesis. II. *Gerbera jamesonii*. Proc.Int.Symp. *Nuclear Techniques and in vitro culture for plant Improvement (pp.155-159)*. IAEA/FAO, Vienna.

Emmanuel E. and A. Levy. 2002. Tomato mutants as tools for functional genomics. Current Opinion in Plant Biology. 5:112-117.

Nonomura T., Y. Ikegami, Y. Morikava, Y. Matsuda and H. Toyoda.2001. Induction of morphologically changed petals from mutagen- treated apical buds of rose and plant regeneration from varied petal-derived calli. Plant Biotechnology.18 (3):233-236.

Barzegari A., S. Zununi Vahed, S. Atashpaz, S. Khani and Y. Omidi. 2010. Rapid and simple methodology for isolation of high quality genomic DNA from coniferous tissues (*Taxus baccata*).

Mol. Biol. Rep.37:833-837.

Bala M. and K. Palsingh. 2015. *In vitro* mutagenesis in rose (*Rosa hybrida* L.) CV.Raktima for novel traits. Indian Journal of Biotechnology.Vol.14.pp:525-531.

Ganesan M., P. Bhanumathi and N. Jayabalan. (2005). Mutagenic effect of sodium azide on somatic embryo regeneration and root growth of cotton (Gossypium hirsutum L. CV. SVPR2). Journal of Agricultural Technology 1(2): 365-380.

Xi M., L. Sun, S. Qiu, J. Liu, J. Xu and J. Shi.2012. In vitro mutagenesis and identification of mutants via ISSR in lily (*Lilium longiflorum*). Plant Cell Rep. 31:1043–1051.

Senapati S.K. and G. R. Rout (2011) In vitro mutagenesis in Rosa hybrida using oryzalin as a mutagen and screening of mutants by randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) marker. African Journal of Biotechnology, 10(30): 5705-5712.

The influence of chemical mutagens on morphological traits in three rose(*Rosa hybrida* L.) genotypes proliferated from nodal and leaf explants

Mahdieh Haghighat Afshar[1]*, Ahmad Khalighi [2], Maryam Jafarkhani Kermani[3], Abolghasem Mohammadi[4] and Aliakbar Habashi[3]

[1*] Department of Horticultural Science, Faculty of Agriculture, Islamic Azad University, Tabriz branch

[2] Department of Horticultural Science, Faculty of Agriculture, Science & Research Branch, Islamic Azad University, Tehran branch

[3] Department of Tissue Culture and Gene Transformation, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), Karaj, Iran.

[4]Department of Plant Breeding, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran.

[*]*: mhafshar@iaut.ac.ir*

Abstract

In this research in order to find $LD_{50,}$ nodal and leaf explants which the leaf explants' direct regeneration had been optimized previously, had been treated with different doses of two different mutagens (Sodium Azide(SA) and Ethyl Methanesulphate(EMS)). Significant increasing was observed in shoot number, shoot length and internode size of plants that nodal sections were exposed to LD_{50} of SA. Lethal dose of EMS effect on leaf explants of Maroussia increased the flower length and wide and petal number and decreased malformed flowers of regenerated plants. All plants of three genotypes were analyzed with 9 ISSR primers. UPGMA cluster analysis and Jacard similarity index classified mutant and control plants in to different group. Remarkable genetic distance was observed between mutant and control plants. Maximum R2 was 0.91 for shoot length.

Keywords: Sodium Azide, Ethyl Methanesulphate, Direct regeneration, LD_{50}, ISSR

IrHC2019