بررسی اثر دزهای مختلف پرتو گاما روی زنده‌مانی و باززایی کالوس ارقام مختلف برنج (*Oryza sativa*) در شرایط درون شیشه

لیلا باقری*[۱]، اعتماد مصلح[۲]، هادی فتح اللهی[۱]، مسعود رحیمی[۱]

[۱]-پژوهشکده تحقیقات کشاورزی، پزشکی و صنعتی پژوهشگاه علوم و فنون هسته ای- کرج

۲- دانشگاه آزاد اسلامی(واحد کرج) دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی

چکیده

روشهای کلاسیک اصلاح نباتات با بهره‌گیری از قوانین ژنتیک در چند دهه اخیر باعث پیشرفتهای اعجاب انگیزی در زمینهٔ تولید غلات و دیگر گیاهان در سطح دنیا گردیده‌اند، اما از جمله معایب عمده این روش‌ها، محدود بودن منابع ژنتیکی می‌باشد، به طوریکه این روشها محدود به تولید مثل جنسی می‌شود و تولید مثل جنسی نیز از نظر تئوری فقط در داخل گونه امکانپذیر می‌باشد. در سه دهه اخیر استفاده از تکنیک‌های هسته‌ای و بیوتکنولوژی کشاورزی، به ویژه در ارتباط با گیاهان تراریخت و موتانت، چشم اندازهای امیدوارکننده‌ای را ارائه نموده است. تنوع ژنتیکی یکی از ضروریات اصلی برای انجام فعالیت‌های اصلاح نباتات است و جهش‌ها این تنوع را افزایش می‌دهند. لذا انتخاب دز مناسب موتاژن و اطلاع از نوع تأثیر آن برای القاء تنوع در گونه‌های مختلف گیاهی از گام‌های اولیه این‌گونه پروژه‌ها می‌باشد. در این تحقیق کالوس‌های سه رقم برنج توسط پرتو گاما حاصل از کبالت ٦٠ با دزهای ۰، ۲۰، ٤٠، ٦٠، ۸۰ و ۱۰۰ گری پرتوتابی شدند و طی آن صفات درصدزنده‌مانی و باززایی مورد ارزیابی قرار گرفتند. نتایج نشان داد بین ارقام برای صفت درصد باززایی به لحاظ آماری اختلاف معنی داری وجود ندارد، اما برای صفت درصد زنده‌مانی اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۱٪ مشاهده شد که در آن بالاترین میانگین مربوط به ارقام فجر و ٥٤ و کمترین مربوط به رقم ١٤٤ بود. در دزهای مختلف پرتو گاما نیز تأثیر منفی و معنی‌داری متناسب با افزایش دز برروی صفات مورد بررسی مشاهده شد. در نهایت با محاسبه LD_{50} ، دز مناسب پرتو گاما با روش رگرسیون خطی ساده برای رقم فجر (٤٣/٣٢ گری) و رقم ٥٤ (٢٣/١٧ گری) و رقم ١٤٤ (١٦/٩٠ گری) تعیین شد.

واژه های کلیدی: *برنج، رقم ، پرتو گاما، زنده مانی، باززایی*

مقدمه

برنج یکی از گیاهان مهم تیره غلات می‌باشد که منبع اصلی غذای بیش از یک سوم جمعیت جهان را به خود اختصاص داده است. با توجه به افزایش روز افزون جمعیت، نیاز شدید به افزایش عملکرد در واحد سطح و بهبود کیفیت در این گیاه ضروری به نظر می‌رسد [۱]. در این راستا استفاده از تکنیک موتاسیون جهت ایجاد تنوع ژنتیکی و تکنیکهای وابسته به کشت بافت و بیوتکنولوژی در گیاهان زراعی به منظور ارتقاء صفات کمی و کیفی و کاهش زمان اصلاح نباتات از اهمیت خاصی برخوردار است[۲].

مین و همکاران(۱۹۹۱) به منظور اصلاح برنج از دز پایین پرتو گاما بر روی کالوس استفاده کردند[۳]. کویی وهمکاران (۲۰۰۳) تعداد ٦ رقم برنج متحمل به شوری از طریق موتاسیون به دست آوردند[٤]. گائو و همکاران(۱۹۹۲)نشان دادند که محدوده دز اپتیمم برای جنین های بالغ برنج ۲/۵ تا ۵ کیلو راد می‌باشد[۵]. لی یو و همکاران(۱۹۹۷)در تحقیق دیگر کشتهای کالوس برنج را در معرض دزهای مختلف پرتو گاما قرار دادند و دز اپتیمم را ۲۰ گری گزارش کردند[٦]. زاپاتا و همکاران (۱۹۸٦) کالوس های برنج رقم Basmati-۳۷۰ را در معرض تابش ۲۰ کیلوراد پرتو گاما قرار دادند و کاهش کالوس‌زایی را مشاهده کردند[۷]. کیم و همکاران(۲۰۰٤) جهت افزایش محتوی آمینواسید تریپتوفان در کولتیوار برنج Donganbyeo، کالوس های حاصل از کشت جنین را تحت تأثیر دز ۵۰ گری پرتو گاما قراردادند[۸]. مقاله حاضر نتیجه بررسی میزان زنده مانی و باززایی کالوس های سه رقم برنج در اثر پرتو گاما و همچنین تعیین دز مناسب بر روی کالوس های آن جهت ایجاد تغییرات ژنتیکی در ژنوم برنج می باشد که امید است در پروژه های اصلاحی این گیاه از طریق القاء موتاسیون مفید واقع گردد.

روش کار

بذور برنج بکار رفته در این تحقیق شامل ارقام ۱٤٤، ٥٤ و فجر بودند که از مؤسسه تحقیقات کشاورزی برنج آمل تهیه گردیدند. در ابتدا بذور با استفاده از الکل ۷۰٪ به مدت دو دقیقه تیمار شدند و بعد به مدت ۱۵ دقیقه با غوطه‌ورکردن آنها در وایتکس ۱۵٪ همراه با دو قطره توئین، ضدعفونی سطحی شده و با آب مقطر دو بار استریل شستشو شدند. بعد از پوست‌کنی، مراحل استریل بذور با تیمارها و ترکیبات ضدعفونی کننده قبل به مدت ۲۵ دقیقه ادامه یافت و در نهایت بذور جهت شستشو با آب مقطر دو بار استریل به داخل محفظه لامینار منتقل شدند. کشت جنین بالغ برنج درسه رقم مختلف در محیط‌کشت کالوس‌زایی MS، همراه با ۲ میلی‌گرم در لیتر هورمون توفوردی، ۰/۱گرم در لیتر مایواینوزیتول، ۳٪ساکارز و ۰/۷٪ آگار صورت گرفت و بعد از کشت به مدت چهار هفته در داخل انکوباتور و با شرایط تاریکی و دمای ۲۷ ± ۱^{o}c قرار داده شدند. بعد از اینکه کالوس‌های جنین‌زا از کالوس‌های غیرجنین‌زا براساس صفات مورفولوژیکی جدا شدند، به منظور تکثیر بیشتر در محیط کشت‌های جدید و با ترکیبات محیط‌کشت قبلی واکشت شدند. کالوس‌های جنین‌زا توسط پرتو گاما حاصل از کبالت ٦۰ با ٦ دز مختلف(*دزهای ۰، ۲۰، ٤۰، ٦۰، ۸۰ و ۱۰۰ گری*) پرتودهی شدند بطوریکه تعداد۳۰ تا٤۰ کالوس برای هر سطح پرتودر نظر گرفته شد. سه هفته بعد از پرتوتابی درصد زنده‌مانی کالوس‌های پرتو دیده و شاهد (بر اساس شمارش تعداد کالوس‌های زنده و نکروزه نشده و به صورت درصدی از کالوس‌های داخل هر پتری‌دیش) محاسبه گردیدند. کالوس‌های جنین‌زای پرتو دیده و شاهد جهت باززایی روی محیط کشت LS همراه با هورمون‌های نفتالین اسید استیک(۰/۵ میلی‌گرم در لیتر) و بنزیل آمینوپورین(۱ میلی‌گرم در لیتر) کشت گردیدند ودر اتاقک رشد با فتوپریود ۱٦ ساعت روشنایی و ۸

ساعت تاریکی در دمای c ۲۶° قرار داده شدند(شکل۱). بعد از گذشت حدوداً سه هفته آماربرداری از کالوس‌های باززا شده جهت مقایسه درصد باززایی کالوس‌های پرتو دیده و شاهد انجام گرفت. زمانیکه گیاهچه‌ها حدوداً ۳ تا ٤ سانتی متر رشد نمودند، به محیط ریشه‌زایی که شامل ترکیبات محیط‌کشت LS و بدون هورمون بود منتقل(در شرایط استریل) و به مدت دو هفته در اتاقک رشد و دمای c ۲۶° نگهداری شدند(شکل۱). این گیاهچه‌ها جهت توسعه بیشتر ریشه و سازگاری با شرایط طبیعی به محلول غذایی یوشیدا انتقال یافتند. نهایتاً گیاهان به گلدان منتقل شده و تا مرحله برداشت بذور تحت مراقبت‌های لازم قرار گرفتند(شکل۲).این تحقیق در قالب آزمایش فاکتوریل و با ۱۰ تکرار بر پایه طرح کاملاً تصادفی انجام گرفت و داده‌ها بعد از انجام تبدیلات لازم با استفاده از نرم افزارهای MSTATC وSAS آنالیز شدند.

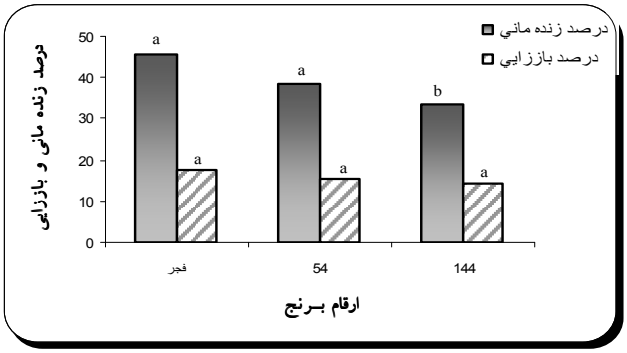
نتایج و بحث

تجزیه واریانس صفات برای دزها و ژنوتیپ‌های مختلف نشان داد که بین ژنوتیپ‌ها برای صفت درصد زنده‌مانی اختلاف کاملاً معنی‌داری با سطح احتمال ۱٪ وجود دارد، ولی این اختلاف برای صفت درصد باززایی به لحاظ آماری معنادار نشد. بررسی دزهای مختلف پرتو گاما مورد استفاده در این آزمایش نیز نشان داد که بین آنها اختلاف کاملاً معنی‌داری در سطح احتمال ۱٪ به لحاظ هر دو صفت وجود دارد (جدول ۱). با مطالعه بیشتر و مقایسه میانگین‌ها معلوم شد، بالاترین میانگین صفت درصد زنده‌مانی، در ارقام فجر و ٥٤ و کمترین آن در رقم ١٤٤ وجود دارد(نمودار۱).

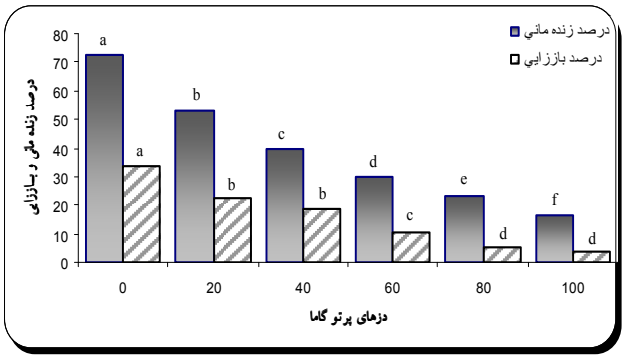
جدول ۱- تجزیه واریانس ساده صفات مختلف در دزهای مختلف پرتو گاما برای سه رقم برنج

منابع تغییر	*df*	*درصد باززایی*		*درصد زنده مانی*	
		MS	F	MS	F
ژنوتیپ	۲	۰/۰٤۱	۱/۹۳ ns	۰/۱۷٦	۰/۰۰۱**
پرتوگاما	٥	۱/۲٦۲	٥۸/۸٥**	۱/۰۷۲	٦۷/۹۲**
ژنوتیپ × پرتو گاما	۱۰	۰/۰۰٤	۰/۲ns	۰/۰۲٥	۱/٦۳**
خطا	۱٦۲	۰/۰۲۱٤		۰/۰۱٥۷	
ضریب تغییرات		۱۰/۸۳۱		۷/٦٥۸	

ns : اختلاف معني دار وجود ندارد، ** : اختلاف معني دار در سطح احتمال۱%



نمودار ۱- تغییرات درصد زنده مانی و باززایی در ارقام مختلف برنج



نمودار ۲- تغییرات درصد زنده مانی و باززایی در دزهای مختلف پرتو گاما

نتایج حاصل از مقایسه میانگین‌ها برای دزهای مختلف پرتو گاما نیز بیانگر آن بود که بعد از شاهد(بدون پرتوتابی) بیشترین میانگین درصد باززایی در دزهای ۲۰و۴۰ و کمترین آن در دزهای۸۰ و۱۰۰ وجود دارد. این اثر و روند تغییرات برای صفت درصد زنده‌مانی اندکی متفاوت و با تعداد گروه‌بندی بیشتر دی‌ده شد. چراکه برای این صفت، میانگین هر دز بطور معنی‌داری در یک گروه جای گرفت، بطوریکه با افزایش دز، اثر کشندگی پرتو گاما بیشتر و در نتیجه آن درصد زنده‌مانی کاهش یافت. همچنین بیشترین میانگین پس از نمونه‌های شاهد مربوط به دز ۲۰ گری و کمترین برای دز ۱۰۰گری ثبت گردید(نمودار ۲).

آثار تخریبی پرتو بر روی سلول ها و ایجاد جهش های نامطلوب و نیز اثرات مخرب ناشی از رادیکال‌های آزاد و دیگر مواد بازدارنده رشد سلول‌ها در توده کالوس در اثر تیمار پرتو گاما را می‌توان به عنوان علل مرگ وعدم زنده مانی سلولهای کالوس در نظر گرفت[۹و۱۰و۱۱]، بطوریکه شاید حتی بتوان تخریب شدید ساختمان کروموزوم‌ها و اختلال در بیشتر فعالیت‌های سلولی را نتیجه این گونه پرتوهای یونیزه کننده دانست[۱]. در مجموع می‌توان گفت احتمالاً پرتو گاما اثرات مخربی بر کالوس‌ها داشته و با افزایش دز پرتو این اثر بیشتر می‌شود، تا حدی که حتی این اثر در باززایی کالوس‌های زنده مانده از پرتوتابی نیز قابل مشاهده است و کالوس‌های پرتوتابی نشده(شاهد) به طور معنی‌داری میزان باززایی بیشتری داشتند.

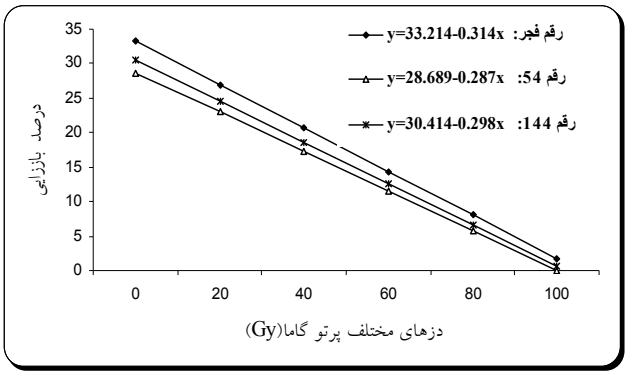
باتوجه به معنی دار بودن اثر متقابل ژنوتیپ و پرتو گاما در صفت در صد زنده مانی مشخص می شود سطوح مختلف پرتو گاما بر روی کالوس های ژنوتیپ های مختلف تاثیرات متفاوتی داشته است، البته برای بررسی بیشتر با استفاده از جبر رگرسیون، معادلات خطی برای هر رقم برای هر دو صفت درصد زنده مانی و درصد باززایی برازش شدند(نمودارهای ۳ و ٤)، همان طور که در نمودارهای مربوطه مشخص است، شیب خطوط رگرسیون برای ارقام مختلف در صفت درصد باززایی نسبت به درصد زنده‌مانی بیشتر به یکدیگر نزدیکند و این موضوع نشان از حساسیت بیشتر کالوس ارقام مختلف به پرتو گاما برای صفت درصد زنده‌مانی می‌باشد. برای تعیین بهترین دز جهت پرتو تابی باید مراقب بود که میزان دز به حدی زیاد نباشد که تمام جمعیت

نمونه را از بین ببرد و یا به حدی هم کم نباشد که فاقد جهش‌زایی کارا و مؤثر گردد. دزی که بتواند ۵۰٪ نمونه ها را از بین ببرد (LD_{50})، به عنوان دز ایده آل شناخته شده و معمولاً ۲۰٪ ± این مقدار را به عنوان دز مناسب در پروژه های اصلاحی بکار می برند [۹]. برای تعیین دزهای LD_{50}در این تحقیق از نتایج مربوط به صفت در صد زنده مانی کالوس ها استفاده شد. در این راستا با بهره گیری از معادلات ۱ تا۳ مربوط به هر رقم در این صفت دزها محاسبه گردیدند بنا برای‌ن می‌توان این دزها را بعنوان دز مناسب جهت القاء موتاسیون در کالوس‌های برنج بکار برد.

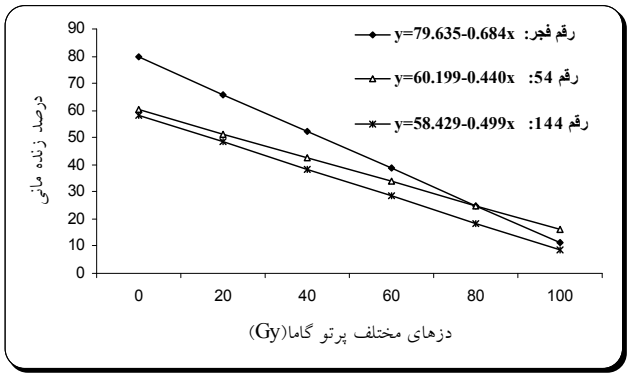
رابطه(۱) $y_{fajr} = 79.635 - 0.684\,x \Rightarrow LD_{50} = 43.32$

رابطه(۲) $y_{54} = 60.199 - 0.440\,x \Rightarrow LD_{50} = 23.17$

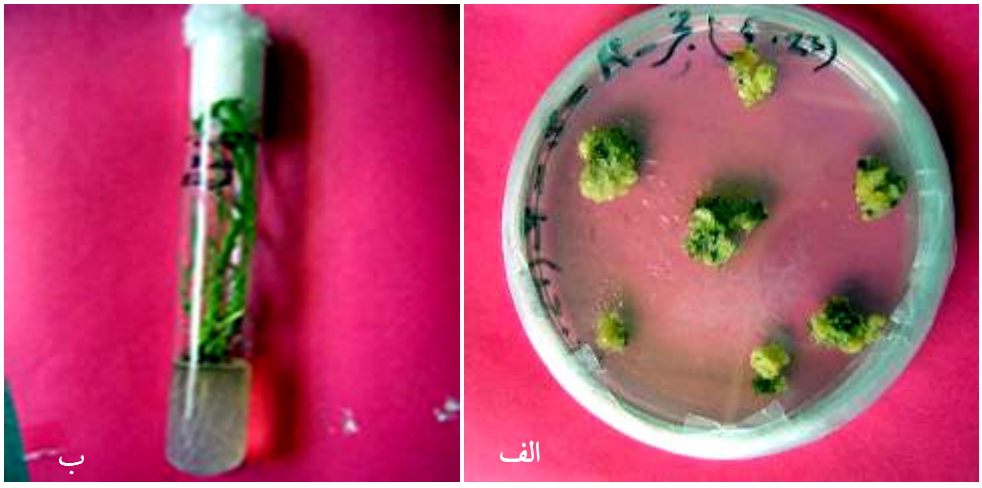
رابطه(۳) $y_{144} = 58.429 - 0.499\,x \Rightarrow LD_{50} = 16.89$



نمودار ۳- برازش مدلهای خطی تأثیر دزهای پرتو گاما بر روی صفت درصد باززایی در سه رقم برنج



نمودار ۴- برازش مدلهای خطی تأثیر دزهای پرتو گاما بر روی صفت درصدزنده‌مانی در سه رقم برنج



شکل ۱- کالوس‌زایی و باززایی جنین بالغ(الف)، انتقال گیاهچه‌های جوان باززا شده به محیط ریشه‌زایی(ب).

شکل ۲- انتقال گیاهچه‌های ریشه‌دار شده به محلول غذایی(الف) و انتقال گیاهچه‌های جوان از محیط ریشه‌زایی به گلدان و محیط گلخانه(ب).

مراجع

1-M.F.Hossain and M.S.Alam. Effect of gamma irradiation on the callus, developed from indica rice. Pakistan Journal of Biological Sciences, 4 (6): 670-671, 2001

۲-ودادي، س. و س.ج.رستگاري. استفاده از موتاسيون و كشت بافت در ايجاد تغييرات ژنتيكي مطلوب در گياهان زراعي. كشاورزي پايدار. ۱۳-۱۱.پائيز ۱۳۸٤.

3-Min, S., Z.Xiang, X. Qi and C. Zhao.Effects of gamma-ray radiation treatment on somatic cell cultura in rice. Cer. Res.Comm. 19:201-208. 1991

4-Quy, T. D., et al. Using Nuclear Techniques for improving salt tolerant Rice in Viet Nam. Bangkok, Thailand 10-14 Nov. pp.43-48. 2003

5-Gao, M.W., Q.H. Cai and Z.Q. Liang. In vitro culture of hybrid indica rice combined with mutagenesis. Plant Breed, 108: 104-110. 1992

6-Lu, M., C.L want and M. Shen. Effect of gamma irradiation on the rormation of calli and regeneration of green plants in rice anther culture. Acta Agriculturae Zhejiangenesis, 9: 123-126. 1997

7-Zapata F.J. R.R.Aldemita, L.B. Torrizo, A.u. Novero, S.K. Rina and R.R.Rola.Anther culture of Basmati 370 at IRRI.A Gamma-ray induced green Plant regenerayion.IRRN. 2:22-23.1986

8-Kim. S. D. I.S. Lee .C.S.Jang. Development of AFLP-derived STS markers for the selection of 5-methyltryptophan- resistant rice mutants.Plant Cell Rep 23:71-80. 2004

۹-مصلح، ا.، اميدي م.، محمدي ع.، خياباني ن. ب. تأثير دزهاي مختلف پرتو گاما بر چگونگي رشد بافت كالوس و تعيين دز مناسب براي القاء موتاسيون در سلولهاي سوماتيك كلزا (Brassica napus L.). مجموعه مقالات پنجمين همايش ملي بيوتكنولوژي جمهوري اسلامي ايران. ۳۵۰. آذر ۱۳۸٦.

10-IAEA. Manual on mutation breeding-technical reports. Series no. 119. 1995

11-Siddiqi, B. D. Mutagenesis: Tools and Techniques-a special view. In: Breeding in crop plants-mutagenesis and in vitro mutation breeding. B. A. Siddiqui and S., Khan [eds]. KI Pub. 1999.