مجموعه مقالات
چهارمین همایش ملی کاربرد فناوری هسته‌ای در علوم کشاورزی و منابع طبیعی
(۲۹-۳۰ اردیبهشت، ۱۳۹٤، پژوهشکده کشاورزی هسته ای)
The 4th National Congress on Nuclear Technology Application in Agricultural & Natural Resource Sciences (19-20 May, 2015, Nuclear Agriculture Research School)

القا جهش با استفاده از پرتو گاما به منظور اصلاح رنگ بذر در ارقام لوبیای سیاه

بهنام ناصریان خیابانی*[۱]، محمد رضا بی همتا[۲] ، هادی فتح‌الهی[۱]، منصور نوری[۱]، مهدی محمدی
۱. پژوهشکده کشاورزی هسته‌ای، پژوهشگاه علوم و فنون هسته‌ای
۲. گروه اصلاح نباتات دانشکده کشاورزی- دانشگاه تهران
bnaserian@nrcam.org

چکیده: پس ازغلات دومین منبع مهم غذایی بشر، حبوبات است که متعلق به خانواده بقولات (Fabaceae) می‌باشند. در بین حبوبات رتبه اول ازنظر سطح زیرکشت و ارزش اقتصادی، متعلق به لوبیا است. رنگ بذر از صفات مهم زراعی است که در بازار پسندی لوبیا نقش مهمی دارد. ارقام لوبیای سیاه دارای خصوصیات مطلوبی نظیر مقاوت به بیماری‌ها، عملکرد بالا و ... هستند. اما به دلیل رنگ پوسته بذر کشت آن‌ها محدود می‌باشد. در این آزمایش، ۸ رقم لوبیا سیاه به منظور تغییر رنگ بذر با پرتو گاما تیمار شدند. بذور این هشت رقم پس از تنظیم رطوبت در حدود ۱۱-۱۳٪، با اشعه گاما (دزهای مورد استفاده ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰، ۲۵۰ و ۳۰۰ Gy گری از منبع کبالت ۶۰)، مورد پرتو تابی قرار گرفتند. دز مناسب پرتو تابی با استفاده تجزیه رگرسیون و برازش مدل خطی، تعیین شد. جمعیت موتانت با استفاده از دز مناسب ایجاد شد، در نسل دوم تعدادی بوته بارنگ بذر زیتونی، سفید از ارقام KH-34، KH-28، KH49 به دست آمد. کشت این لاین‌ها و تفکیک صفات در نسل‌های بعدی منجر به دستیابی به موتانت‌هایی بارنگ‌های سفید تا قرمز تیره گردید.

واژگان کلیدی: رنگ بذر، لوبیا سیاه، جهش، پرتو گاما

Mutation induction using gamma rays in order to modify seed coat color of black bean

Behnam Naserian Khiabani*[1], Mohammad Reza Bihamta[2], Hadi Fatollahi[1], Mansor Nori[1], Mehdi Mohammadi[1]
1. Nuclear Agricultural research School, Nuclear science and technology
2. Plant Breeding Dep., Agricultural college, Tehran university
bnaserian@nrcam.org ۳.

Abstract: Beans the second most important source of human food grain which belongs to the legume family (Fabaceae). In terms of area and economic values, the first rank among grains belongs to the bean. Seed color of important agronomic traits in common bean that plays an important role against marketability. Black bean cultivars planted is limited with desirable properties such as resistance to disease and higher yields because of the seed coat color. In this research, 8 varieties of black beans to change the color of the seeds were treated with gamma radiation. After adjusting seed humidity to 11-13%, they were irradiated with gamma radiation (doses of 50, 100, 150, 200, 250 and 300 Gy of 60 Co source). Appropriate dose irradiation was determined using linear regression analysis and model fitting. Mutants population were created using the proper dose, In the second generation some mutant with olive and white seeds coat color,produced from varieties KH-34, KH-28, KH49.in next-generation some mutant with with to red seed coat color produced.

Key words: seed coat color, Black Bean, Mutation, Gamma ray

مقدمه

با توجه به‌احتمال افزایش جمعیت جهان تا سال ۲۰۵۰ میلادی تا ۶ بیلیون نفر و افزایش نیاز به غذا و مشکلات موجود در زمینه تنش‌های زیستی و غیر زیستی، نیاز به اصلاح گیاهان بسیار لازم و ضروری است [۱]. پس از غلات، دومین منبع مهم غذایی بشر، حبوبات هستند. رنگ بذر از صفات مهم زراعی است که در بازار پسندی لوبیا نقش مهمی دارد. ارقام لوبیای سیاه دارای خصوصیات مطلوبی نظیر مقاوت به بیماری‌ها، عملکرد بالا هستند؛ اما به دلیل رنگ پوسته بذر کشت آن محدود می‌باشد. با القا جهش توسط موتاژن‌های (فیزیکی و شیمیایی) طیف رنگی مختلفی از سفید تا قهوه‌ای در لوبیای سیاه بدست آمده است[۲].رنگ بذر از رنگ سیاه تا بژ در نتیجه موتاسیون در موتانت های لوبیا گزارش شده است، همچنین در جمعیت M_3 این گیاهان پاکوتاهی، زود رسی و عقیمی بالا مشاهده شده‌است[۳]. نتایج آزمایش الروبایی ثابت کرد رنگ دانه‌ها در نتیجه جهش به آسانی تغییر می‌کنند، این صفت می‌تواند در جهت تایید وقوع جهش در جمیت‌های پرتوتابی شده لوبیا استفاده شود [۲]. رنگ بذر تحت کنترل یک مکان ژنی با حداقل سه آلل می‌باشد که تعدادی ژن تغییر دهنده نیز بر روی این صفت تاثیر می‌گذارند[۴].موتاسیون روش تکمیلی در اصلاح گیاهان یکساله خودگشن است، در لوبیا با استفاده از این روش ارقام با عملکرد بالا[۳، ۵، ۶ و ۷] میزان پروتئین بذر[۵، ۶و۸] مقاومت به بیماری‌ها[۶و۸] ،تغییرخصوصیات بذر مانند رنگ و اندازه بذر[۹و۱۰] استفاده شده است. سنا و همکاران[۱۱] در سال ۱۹۹۱ استفاده از پرتوگاما در جهت تغییر خصوصیات بذر را گزارش کردند. ایشان دزهایی در محدوده ۰، ۶۰، ۱۲۰، ۱۸۰، ۲۴۰، و ۳۰۰ گری را به‌کاربردند. حداکثر فراوانی بروز جهش در خصوصیات بذر شامل رنگ وشکل بذر و نیز تغییر رنگ گل در دز ۲۴۰ گری گزارش شده است.

این تحقیق با هدف ایجاد تنوع ژنتیکی در ارقام بومی لوبیا سیاه و انتخاب موتانت های با تغییر رنگ بذر اجرا گردید.

مواد و روش‌ها

در این آزمایش ۸ لاین از مرکز تحقیقات حبوبات خمین موردبررسی قرار گرفتند. رطوبت بذور قبل از پرتو تابی در حدود ۱۱-۱۳ درصد تنظیم شد. . دزهای اشعه گاما مورداستفاده ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰، ۲۵۰ و ۳۰۰ Gy (گری) .از منبع کبالت ۶۰ بودند. بذرها پس از پرتو تابی بلافاصله به مزرعه تحقیقاتی پژوهشکده کشاورزی هسته‌ای منتقل شدند و به‌صورت ردیفی (بافاصله ۱۰×۷۵ سانتی‌متر) در اردیبهشت‌ماه کاشته شدند. به منظور بررسی حساسیت به پرتو، آزمایشی در قالب طرح بلوک‌های کاملا تصادفی با سه تکرار اجرا شد. صفات ارتفاع بوته و طول غلاف، تعداد غلاف در بوته و تعداد دانه در بوته اندازه‌گیری شدند. نسل M_2 با بذرگیری از تمام بوته‌های نسل اول که تولید بذر کرده بودند ایجاد شد. در سال دوم بذور برداشت شده به تفکیک دز و رقم به صورت جداگانه در روی خطوط کشت شدند. انتخاب رنگ بذر با باز کردن غلاف در مرحله رسیدگی کامل و بررسی رنگ بذرها در هرسال انجام گرفت. تجزیه آماری به کمک نرم‌افزارهای SAS 9.3 انجام شد.

نتایج و بحث

تجزیه واریانس برای صفات اندازه‌گیری شده در نسل اول(جدول ۱) وجود اختلاف معنی دار بین ژنوتیپ‌ها برای تمام صفات اندازه را نشان داد. همچنین اثر پرتو گاما بر روی تمام صفات بجز ارتفاع بوته معنی دار بود. اثر متقابل ژنوتیپ و دز

پرتو به‌جز برای تعداد غلاف رسیده و تعداد دانه در بوته برای سایر صفات اختلاف معنی‌دار نشان داد. مقایسه میانگین بین سطوح دز پرتو (جدول۲) نشان داد که کاهش در صفات اندازه‌گیری شده عموماً در دزهای بالا (۱۵۰ گری و بیشتر) اتفاق می‌افتد. به‌منظور موفقیت در یک برنامه اصلاحی به کمک موتاسیون باید دز مناسب مشخص شود. برای تعیین بهترین دز جهت پرتو تابی باید به دو نکته توجه کرد: اول آنکه میزان دز کاربردی نباید به حدی زیاد باشد که گیاهان را از بین ببرد؛ همچنین دز کاربردی باید به گونه‌ای انتخاب شود که فراوانی وقوع موتاسیون به‌اندازه کافی باشد. دزمناسب دزی است که بتواند باعث کاهش ۳۰ تا ۴۰٪ رشد شود(۱۲ و ۱۳). تجزیه رگرسیون تأثیر پرتوگاما برای صفات اندازه‌گیری شده، نشان داد به‌جز ارتفاع بوته، سایر صفات از روند خطی پیروی می‌کنند. اندازه‌گیری طول ساقه در زمان ۲-۴ برگی فاکتور مناسبی در شرایط آزمایشگاهی برای تعیین دز مناسب است (۱۲)؛ اما ارتفاع بوته در شرایط مزرعه برای این منظور مناسب نبود. بررسی روند کاهشی ارتفاع بوته نشان می‌دهد که این صفت حساسیت لازم برای تعیین دز مناسب را ندارد و تغییرات آن در دزهای مختلف اشعه گاما تفاوت معنی‌داری نداشتند؛ بنابراین استفاده از صفات دیگر پیشنهاد می‌شود. ۴ صفت طول غلاف، تعداد غلاف، تعداد غلاف رسیده و تعداد دانه در بوته، روند کاهشی تقریباً همسان را با افزایش دز پرتوگاما نشان می‌دهند. بنابراین می‌توان از هرکدام از این صفات در جهت تعیین دزمطلوب استفاده کرد، اما از آنجایی تعداد دانه در بوته و تعداد غلاف رسیده بیشترین ضریب تبیین (R^2) (به ترتیب ۹۵/۶۴٪ و ۹۵/۳۵٪) را دشتند. از معادلات مربوطه برای تعیین دز مطلوب استفاده شد. برای تعیین دز مناسب در این تحقیق، ۳۰ تا ۴۰ درصد کاهش تعداد دانه در بوته یا تعداد غلاف رسیده (با توجه به اینکه کاهش در این دو صفت می‌تواند درنتیجه کاهش باروری حاصل از پرتودهی در نسل اول باشد) به‌عنوان دز مطلوب در نظر گرفته شد و معادلات زیر برآزش شدند:

$110.13 - 0.35078X = Y$ تعداد غلاف رسیده

$110.723 - 0.38058X = Y$ تعداد دانه در بوته

با توجه به این معادلات دز مناسب در محدوده ۱۵۷ تا ۱۵۹ گری تعیین شد.

جدول :۱ نتایج تجزیه واریانس صفات اندازه‌گیری شده در ۸ رقم لوبیا در نسل اول (M_1)

منبع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات				
		طول ساقه	طول غلاف	تعداد غلاف	تعداد غلاف رسیده	تعداد دانه در بوته
ژنوتیپ	۷	۵۷۸۹/۷۹**	۵۵/۱۱**	۰/۱۶۱۸۶**	۰/۱۹۵۸۶**	۰/۸۱۸۶۶**
دزپرتوتابی	۶	۲۶۹۰/۱۱ns	۱۵۵/۰۱۵**	۰/۵۴۹۹۴**	۰/۵۱۶۷۰**	۲/۲۵۸۷۶**
ژنوتیپ*دزپرتوتابی	۴۲	۲۶۰۴/۷۵**	۱۴/۹۵۶**	۰/۰۸۲۶۵**	۰/۰۳۲۸۳ns	۰/۰۹۸۲۳ns
خطا	۱۱۰	۱۵۲۳/۶۳	۴/۱۴۵	۰/۰۳۰۸۸	۰/۰۲۵۷۶	۰/۰۹۴۵۴
ضریب تغییرات	-	۴۱/۹	۲۷/۴۳	۱۲/۴۷	۱۲/۸۸	۲۰/۴۷

** اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۱٪، ns اختلاف معنی‌دار وجود ندارد

جدول ۲. مقایسه میانگین بین دزهای پرتوگاما با آزمون چند دامنه‌ای دانکن در نسل اول (M_1)

دز پرتوگاما	طول غلاف (cm)		تعداد غلاف		تعداد غلاف رسیده		تعداد دانه در بوته	
۰	۹/۲۳	A	/۱۱ ۲۳	A	۱۴/۷۱	A	۵۱/۶۵	A
۵۰	۹/۵	A	/۴۶ ۲۱	A	۱۳/۵۶	A	۵۱/۶۵	A
۱۰۰	۹/۶۱	A	/۲۷ ۲۴	A	۱۲/۹۵	A	۴۳/۷	A
۱۵۰	۸/۲	AB	۱۹/۶	A	۹/۳۳	AB	۲۷/۱۵	B
۲۰۰	۷/۳۴	B	/۰۵ ۱۷	A	۵/۸۸	BC	۱۴/۵۴	BC
۲۵۰	۵/۲	C	۸/۷	B	۱/۹۳	CD	۳/۴۸	CD
۳۰۰	۲/۸۶	D	۳/۵	B	۰/۷۴	D	۱/۷۵	D

میانگین‌هایی که دارای حداقل یک حرف مشترک باشند در سطح احتمال ۵٪ اختلاف معنی‌دار ندارند.

در پایان نسل اول(M_1) از هر بوته زنده مانده که بذر تولید کرده بود دو تا سه غلاف به‌طور جداگانه برداشت شد. بذور برداشت‌شده از هر بوته در ردیف‌های جداگانه کشت شدند(جدول۳). بررسی و گزینش بوته‌ها در زمان رسیدگی با باز کردن غلاف تک‌تک بوته‌ها و مشاهده رنگ بذر برای حدود ۷۰ هزار بوته در طی دو سال انجام شد. از گزینش انجام‌شده تعدادی بوته بارنگ بذر زیتونی و گل‌سفید به دست آمد. بوته های موتانت که رنگ بذر آن‌ها تغییر کرده بود دارای گل سفید بودند(شکل ۱). بوته‌های با بذر سفید نتاج مشابهی تولید کردند اما در بین نتاج حاصل از به دور زیتونی تفرق رنگ و طرح بذر مشاهده شد (شکل ۲).

در نسل سوم بین خطوط تنوع دیده می‌شد، اما درون‌خط‌ها تنها در ژنوتیپ‌های زیتونی تنوع وجود داشت. به‌عبارت‌دیگر موتانت‌های سفید تفرق نشان نداند. رنگ بذر توسط ۷ گروه ژنی کنترل می‌شود که یک ژن بزرگ اثر مسئول تولید رنگدانه‌ها است. جهش در این ژن منجر به توقف مسیر تولید رنگدانه و تولید بذور سفید می‌شود. همچنین بذور بارنگ صورتی که از بذور زیتونی ایجادشده بودند تنها به رنگ صورتی تفکیک نشان دادند؛ بنابراین موتانت‌های رنگ بذر شامل طیف رنگی وسیعی از قرمز تا سفید و رنگ زیتونی بود. همچنین در تعدادی از این موتانت‌ها طرح پوشش بذر نیز تغییریافته بود که به شکل راه‌راه و یا لکه‌ای دیده می‌شد. پس از ۴ نسل میزان

شکل ۱ تنوع ناشی از القا جهش با پرتو گاما در رنگ بذر و گل لوبیای سیاه

شکل ۲ تنوع در رنگ بذر حاصل از القا جهش در ارقام لوبیای سیاه

هتروزیگوتی در جمعیت کاهش‌یافته اما هنوز در برخی لاین‌ها تنوع دیده می‌شود. به‌عنوان‌مثال در ۲٪ موتانت‌هایی که رنگ بذر سیاه داشتند موتانت‌هایی بارنگ‌های به‌جز سیاه (نظیر رنگ قرمز) مشاهده شد(جدول ۴).

نتیجه گیری

دز مناسب برای ایجاد حداکثر جهش در هشت ژنوتیپ مورد بررسی در این آزمایش، ۱۵۷-۱۵۹ گری تعیین شد. امکان تغییر رنگ بذر و نیز طرح رنگی بذر به وسیله پرتو گاما وجود دارد. در تئوری با توجه به تصادفی بودن تاثیر پرتو و هفت گروه ژنی کنترل کننده رنگ و طرح بذر بروز تنوع بالا در رنگ مورد انتظار نیست؛ اما به دلیل بروز نوترکیبی و کراسینگ اور بین ژن‌های موتانت و تیپ وحشی در طی چرخه های میوزی تنوع قابل توجهی در فنوتیپ رنگ و طرح بذر مشاهده شد؛ به عبارت دیگر بروز جهش در ژن های کنترل کننده رنگ و طرح بذر و تغییر پیوستگی ژنی و در نتیجه افزایش

احتمال بروز کراسینگ اور عامل بروز تنوع رنگ در نسل‌های دوم به بعد بوده است. این نظریه با ظهور موتانت با بذر قرمز از موتانت‌هایی با بذر سیاه تایید می‌شود.

جدول ۳ : تعداد تک بوته‌های کشت‌شده در نسل دوم به تفکیک دز و رقم

ژنوتیپ	دز	تعداد بوته کاشته شده	بوته‌های موتانت تغییر رنگ بذر
KH-22	۵۰ Gy	۷۴۰	-
	۱۰۰Gy	۹۰۰	-
	۱۵۰ Gy	۵۸۰	-
	۲۰۰Gy	۲۶۰	-
	۲۵۰Gy	۴۲۰	-
	۳۰۰Gy	۱۰۰	-
KH-23	۵۰ Gy	۹۰۰	-
	۱۰۰Gy	۸۲۰	-
	۱۵۰ Gy	۴۲۰	-
	۲۰۰Gy	۷۲۰	-
	۲۵۰Gy	۷۴۰	-
	۳۰۰Gy	۴۲۰	-
KH-28	۵۰ Gy	۹۰۰	-
	۱۰۰Gy	۸۲۰	-
	۱۵۰ Gy	۸۴۰	۱ بوته (زیتونی)
	۲۰۰Gy	۸۴۰	۱ بوته (زیتونی)
	۲۵۰Gy	۸۴۰	-
	۳۰۰Gy	۱۶۰	-
KH-34	50 Gy	۱۵۶۰	-
	۱۰۰Gy	۱۸۲۰	-
	۱۵۰ Gy	۱۴۰۰	-
	۲۰۰Gy	۱۲۰۰	-
	۲۵۰Gy	۶۲۰	-
	۳۰۰Gy	۶۰۰	۱ بوته (زیتونی)
KH-37	۵۰Gy	۱۱۲۰	-
	۱۰۰Gy	۱۰۲۰	-
	۱۵۰ Gy	۹۰۰	-
	۲۰۰Gy	۵۴۰	-
	۲۵۰Gy	۴۰۰	-
	۳۰۰Gy	۳۶۰	-
KH-38	۵۰Gy	۱۰۰۰	-
	۱۰۰Gy	۷۴۰	-
	۱۵۰ Gy	۶۰۰	-
	۲۰۰Gy	۶۴۰	-
	۲۵۰Gy	۲۸۰	-
	۳۰۰Gy	۳۸۰	۱ بوته (زیتونی)
KH-39	۵۰Gy	۷۴۰	-
	۱۰۰Gy	۹۰۰	-
	۱۵۰ Gy	۶۰۰	-
	۲۰۰Gy	۵۲۰	-
	۲۵۰Gy	۵۰۰	-
	۳۰۰Gy	۲۶۰	-
KH-49	۵۰Gy	۷۶۰	
	۱۰۰Gy	۸۰۰	۱ بوته سفید ۱ بوته زیتونی
	۱۵۰ Gy	۹۰۰	-
	۲۰۰Gy	۲۴۰	-
	۲۵۰Gy	۲۴۰	-
	۳۰۰Gy	۱۴۰	-

جدول ۴: نحوه تفکیک در موتانت‌های نسل ۴ (M_4)

موتانت	رنگ‌های مشاهده‌شده در پایان نسل ۴	درصد موتانت‌های هتروزیگوت
سیاه	قرمز (روشن و تیره) سفید، صورتی، زیتونی	٪۲
زیتونی	سفید، صورتی (روشن و تیره) سیاه، زیتونی	٪۱۳
صورتی	صورتی و سفید	٪۵
سفید	سفید	٪۰

منابع

۱. کوچکی، ع. زراعت حبوبات .۱۳۷۲. انتشارات دانشگاه فردوسی مشهد. صفحه.

2. C. C. MOH.1971. Mutation Breeding in seed- coat colors of Beans (PHASEOLUS VULGARIS L.) Euphytica 20 119-125.
3. Al-Rubeai,M.A.F. 1982. Radiation-induced mutation in phaseaolus vulgaris L. Rev Brasil.Genet V(3):503-515.
4. Hosfield,G.L. Seed Coat Color in Phaseolus vulgaris L.:Its Chemistry and Associated Health Related Benefits. USDA, ARS, MWA, Sugarbeet and Bean Research Unit, Department of Crop and Soil Sciences,Michigan State University, East Lansing, MI 48824-1325.
5. Gotoh, K. (1968). Mutation breeding in soybeans and common beans. Gamma Field Symp. 3: 76-89.
6. Rubaihayo, P.R. (1975). The use of y-ray induced mutations in Phaseolus vulgaris (L). Z. Pflanzenzuchtg. 75:257-261.
7. Hussein, H.A.S. and Disouki, I.A.M. (1979). Mutation breeding experiments in Phaseolus vulgaris (L). II.EMS gamma-ray-induced mutants for yield and protein quantity and quality traits. Egypt J. Genet. Cytol 8: 181-197.
8. Safari, A. (1973). Utilisation de rayons ionisants dans 1*amélioration du haricot (Phaseolus vulgaris L). Ann.Amélior. Plantes 23: 77-81.
9. Mujeeb, K. A. and Greig, J. K.1976. Growth stimulation in Phaseolus vulgaris L. induced by gamma irradiation of seeds. Biologia Plantarum: 18(4) 301-303
10. .Bajaj,Y.P.S. 1970, Effect of Gamma irradiation on growth, RNA, Protein and Nitrogen content of bean callus cultures, Annals of Botany 34: 1089-1096.
11. Sena,J.S.Barbosa, H.M. Vieira,C. 1991. Induced mutation in the Common Bean, Phaseolus vulgaris L. affecting flower color and seed. Rev. Brasil. Genet. 14,4,1033-1039

۱۲. ناصریان و همکاران، ۱۳۸۶، تعیین دز مناسب گاما به‌منظور ایجاد تنوع ژنتیکی در نخود، مجله علوم و فنون هسته ای شماره ۴۲.

۱۳. موسوی، الف. اهری مصطفوی، ح. ناصریان خیابانی، ب. حیدری، م؛ و مجدآبادی، ع. ۱۳۸۸. کشاورزی هسته‌ای (از علم تا عمل). انتشارات پژوهشگاه علوم و فنون هسته‌ای.