



## آزمون حساسیت به اشعه گاما برای تعیین دوز مناسب القاء جهش در زعفران (*Crocus sativus* L.)

فاطمه جهاندار<sup>۱</sup>، علی ایزانلو<sup>۲\*</sup>، محمدقادر قادری<sup>۳</sup>، مسعود رحیمی<sup>۴</sup>

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد اصلاح نباتات، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بیرجند، ایران.

۲- دانشیار، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بیرجند، ایران.

۳- استادیار، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بیرجند، ایران.

۴- مربی، گروه پژوهشی کشاورزی، پژوهشکده کشاورزی هسته‌ای، پژوهشگاه علوم فنون هسته‌ای کرج، ایران.

\*نویسنده مسئول: Email: a.izanloo@birjand.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۱۰/۱۰؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۶/۲۳

### چکیده

زعفران گیاهی تریپلوئید و عقیم بوده و تنوع ژنتیکی طبیعی در آن ناچیز است یا بطورکلی وجود ندارد. یکی از راه‌های افزایش تنوع، جهش‌زایی القایی با کمک جهش‌زاهای فیزیکی از قبیل اشعه گاما است. اولین قدم در راستای القاء جهش، آزمون بردباری تشعشع جهت تعیین دوز مناسب اشعه گاما می‌باشد. لذا، هدف از این تحقیق آزمون حساسیت به دوزهای مختلف اشعه گاما در دو شرایط تیمار سرمایی و بدون تیمار سرمایی بنه‌های زعفران بود. بدین منظور، آزمایشی بصورت فاکتوریل با دو فاکتور پیش تیمار سرمایی (در دو سطح بنه‌ها سرمادیده و سرما ندیده) و دوزهای مختلف اشعه گاما (دوزهای ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰ و ۲۵ گری) به همراه تیمار شاهد (دوز صفر) در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی در سه تکرار انجام شد. خصوصیات رشدی و مورفولوژیکی مانند ارتفاع بوته، تعداد برگ در بوته، وزن خشک برگ‌ها، سرعت رشد، درصد و نرخ سبزشدن در سال اول (MV1)، و صفات مربوط به عملکرد گل مانند متوسط ارتفاع کلاله و وزن خشک کلاله و وزن بنه‌های دختری در سال دوم (MV2)، اندازه‌گیری شد. به منظور بررسی تنوع ژنتیکی نمونه‌های پرتوتایی شده زعفران از نشانگرهای مولکولی RAPD و ISSR به ترتیب با ۶ و ۵ آغازگر استفاده شد. نتایج بررسی نسل MV1 نشان داد که با افزایش دوز اشعه گاما نسبت به شاهد کاهش معنی‌داری برای اکثر صفات وجود داشت. همچنین، نتایج تجزیه واریانس بر روی صفات رشدی در سال دوم نشان داد که اثر فاکتور اشعه گاما و اثر متقابل سرما و اشعه در صفات متوسط وزن بنه‌ها و تعداد بنه و وزن کل بنه‌های دختری در سطح احتمال ۱٪ معنی‌دار بود. آزمون حساسیت به اشعه گاما در صفات متوسط ارتفاع بوته، شاخص و نرخ جوانه‌زنی، وزن بنه‌های دختری و صفت وزن خشک گیاه در دو سطح سرمادیده و سرما ندیده، برای ۵۰ درصد زنده‌مانی در محدوده‌ی دوز  $15 \pm 2$  گری تعیین شد. نتایج نشان داد که نمونه‌های مورد مطالعه در هر دو سیستم نشانگری بین نمونه‌های شاهد (پرتوندیده) با نمونه‌های پرتو دیده چندشکلی وجود داشت. به طورکل نتایج نشان داد که نشانگرهای مولکولی RAPD و ISSR در شناسایی چندشکلی و شناسایی جهش یافته‌ها می‌توانند نشانگرهای سودمندی باشند.

واژه‌های کلیدی: تیمار سرمایی، تنوع ژنتیکی، موتاسیون، چند شکلی، نشانگر مولکولی.

## مقدمه

کلیدی در اشعه دهی مواد گیاهی (بذر، اندام‌های رویشی و زایشی و غیره) دوز تابش (برحسب گری (Gray (Gy) است که میزان انرژی تابشی جذب شده توسط مواد گیاهی می‌باشد. معمولاً فراوانی جهش با افزایش دوز تیمار ماده جهش‌زا به صورت خطی افزایش می‌یابد، اما قابلیت زنده‌مانی و نرخ جوانه‌زنی نیز با افزایش میزان دوز کاهش می‌یابد. بنابراین اولین قدم در تیمار جهش‌زایی، برآورد مناسب‌ترین دوز برای استفاده می‌باشد. دوز جهش‌زای بهینه برای القاء جهش، میزان دوزی است که فراوانی جهش مطلوب را با حداقل خسارت ناخواسته موجب شود. برای جهش‌زاهای فیزیکی، این دوز بهینه از طریق انجام آزمون حساسیت به تشعشع بافت‌ها یا سلول-ها برآورد می‌گردد. از نظر تئوری، بالاترین فراوانی جهش می‌تواند از تیمار جهش‌زایی ایجاد شود که حدود ۵۰ درصد مواد تیمار شده را بکشد، بنابراین دوز  $LD_{50}$  از منحنی حساسیت به اشعه بدست می‌آید (Van Harten & Broertjes, 1989).

در گل داوودی ایجاد تنوع برای رنگ و شکل گل با مواد جهش‌زای شیمیایی و فیزیکی انجام گرفته است (Mahure et al., 2010; Misra et al., 2003). به منظور ایجاد تنوع از طریق جهش‌زایی اشعه گاما در ارقام مختلف گلابول، اثر دوزهای مختلف اشعه گاما (۱۵، ۲۵، ۳۵ و ۵۵ گری همراه با شاهد) در طی دو سال انجام شد. دوز بالای اشعه گاما (۵۵ گری) منتج به حداقل جوانه زنی شد و حداکثر درصد جوانه زنی در تیمار شاهد مشاهده شد. دوزهای ۳۵، ۴۵ و ۵۵ گری برای سه رقم کشنده بود، بطوری‌که هیچکدام در سال اول شاخه گل‌دهنده تولید نکردند (Sisodia & Singh, 2015). در مطالعه‌ی آزمون حساسیت اشعه گاما بر روی کاساوا، کاهش معنی‌داری در وزن، تعداد گره و تعداد برگ نسبت به شاهد گزارش شد که پس از تجزیه رگرسیون و ترسیم نمودار، مقدار  $LD_{50}$  دوز ۶ گری را نشان داد که در نهایت محدودی دوزی ۳ تا ۹ گری را برای القای جهش توسط اشعه گاما بر روی کاساوا بیان شد (Ndofunso et al., 2015). ليو و همکاران (Lu et al., 2007) نیز نشان دادند که استفاده از اشعه گاما (با دوز ۱۰ گری) برای ایجاد جهش و زنده‌مانی در نرگس چینی موفقیت آمیز بوده است (Lu et al., 2007).

زعفران به عنوان گران‌بها ترین محصول کشاورزی و دارویی جهان جایگاه ویژه‌ای در بین محصولات صنعتی و صادراتی ایران دارد (Ghorbani, 2007; Hemati, 2009). حفظ و بقاء زعفران در معرض مشکلات بسیار زیادی قرار دارد که یکی از مهم‌ترین آنها قرارگیری در معرض فرسایش ژنتیکی این گیاه است (Fernández, 2004). آگاهی از تنوع ژنتیکی و مدیریت منابع ژنتیکی ضمن حفاظت ذخایر ژنتیکی گیاهی، قابلیت استفاده آنها را در برنامه‌های اصلاحی افزایش می‌دهد. از آنجا که در زعفران تنوع ژنتیکی کم یا بسیار محدود وجود دارد، به‌نژادگران برای اصلاح و دستورزی زعفران از طریق روش‌های کلاسیک با مشکل مواجه هستند (Grilli Caiola & Canini, 2010). ایجاد تنوع ژنتیکی از اهداف اولیه و اساسی در اصلاح نباتات است. مهمترین عوامل ایجاد تنوع در گیاهان شامل دورگ‌گیری، نوترکیبی و جهش می‌باشند. در گیاهان با تکثیر رویشی که ایجاد تنوع ژنتیکی از طریق تولید مثل جنسی به خاطر عقیمی و پلی پلوئیدی مشکل می‌باشد، القاء جهش ابزار مناسبی برای تولید جهش یافته‌های مفید می‌باشد (Mba et al., 2009). از آنجا که جهش‌های خود به خودی به ندرت اتفاق می‌افتند، القاء جهش با استفاده از مواد جهش‌زای شیمیایی و فیزیکی راه مناسبی برای افزایش فراوانی جهش و ایجاد تنوع در گیاهان محسوب می‌شود (Donini & Sonnino, 1998; Shu et al., 2012). جهش‌ها تغییرات ناگهانی هستند که گاهی بصورت ارثی، اساس تنوع ژنتیکی و ماده خام تکامل را بوجود می‌آورند. طبق آمار موجود در پایگاه داده آژانس بین المللی انرژی اتمی از میان ۳۳۲۰ رقم جهش یافته‌ای که تاکنون بطور رسمی ثبت شده‌اند، بیش از ۲۵۰۰ رقم از طریق روش‌های فیزیکی جهش یافته‌اند که از این تعداد حدود ۷۰۰ رقم به گیاهان زینتی و گل‌ها تعلق دارند (<https://mvd.iaea.org/>).

مزیت اصلی جهش‌زاهای فیزیکی تعیین دقیق دوز (Accurate dosimetry) مورد استفاده، تکرار پذیری قابل قبول و نفوذ بالا و یکنواخت در موجودات پرسلولی، خصوصاً با اشعه گاما، است. تا به امروز اشعه گاما به عنوان راحت‌ترین، مفیدترین و موفقیت آمیزترین ابزار و روش در جهش‌زایی و آزادسازی ارقام زراعی جهش یافته در دنیا شناخته شده است (Shu et al., 2012). عامل

در مطالعه‌ای خان (Khan, 2006) جهت القای تنوع از طریق جهش زایی القایی برای توسعه کلالة زعفران، بنه‌های یکنواخت با وزن ۵-۶ گرم تحت تابش اشعه گاما با دوزهای ۲۵، ۲۰، ۱۵، ۱۰، ۵ گرمی قرار گرفتند. پس از کشت بنه‌های تیمار شده، تأثیر اشعه گاما روی تسریع جوانه‌زنی در دوزهای پایین، و تأخیر در جوانه‌زنی در دوزهای بالاتر، افزایش و کاهش ارتفاع بوته به ترتیب در دوزهای پایین و بالا و همچنین گلدهی در دوزهای پایین گزارش شد. ایشان نتیجه‌گیری کردند که دوزهای بالاتر به دلیل تولید اکسین، باعث تأخیر در رشد و گلدهی است. ایشان کاهش بقا، رشد و باروری را به دلیل ناهنجاری‌های

کروموزومی و جهش در ژن بوده اعلام کرد و تشکیل کلالة ۵ شاخه در بنه‌های زعفران را نتیجه جهش سوماتیک دانست، که منجر به افزایش عملکرد و بازدهی محصول شد (Khan, 2006). در مطالعه‌ی دیگری از پرتو گاما به منظور ایجاد تغییرات مطلوب در کمیت و کیفیت محصول، بنه‌های زعفران در حال خواب تحت تابش دوزهای مختلف (۲/۵، ۵، ۷/۵، ۱۰ گرمی) قرار گرفتند. پس از گلدهی گیاه و بررسی کروموزوم‌ها در تقسیم میتوزی مرستم انتهایی ریشه، ناهنجاری کروموزومی در تیمارهای مربوط به بنه‌های پرتو دیده با دوز ۷/۵ و ۱۰ گرمی به وفور مشاهده شد. این ناهنجاری‌ها در مرحله‌ی متافاز میتوز به صورت کروموزوم‌های حلقوی و قطعات کروموزومی قابل مشاهده بودند (Rastegari et al., 2007). در آزمایشی به منظور افزایش تولید بنه‌های زعفران قبل از اتمام دوره رشدی، القای جهش با استفاده از جهش‌زاهای فیزیکی اشعه گاما و شیمیایی (اتیل متان سولفونات (EMS)، کلشی‌سین، اتیدیوم بروماید) در مراحل مختلف رشد زعفران طی دو هفته روی ۴۴ گیاه که براساس بهترین عملکرد انتخاب شدند، که تیمارهای ۰/۱ درصد EMS و ۰/۰۵ درصد کلشی‌سین با تولید ۱۵ بنه دختری در هر بنه مادری استفاده شدند (Khan et al., 2011). آنها همچنین نشان دادند که که مناسب‌ترین دوز اشعه گاما ۲۰ گرمی بود که، اثر مثبت روی افزایش تعداد بنه دختری در هر بنه مادری داشت (Khan et al., 2011). در مطالعه‌ای به منظور بررسی تأثیر اشعه گاما بر روی رشد زعفران محققین با اعمال تابش دوز ۲۵ گرمی گزارش کردند که، اعمال تیمار اشعه گاما سرعت رشد را تحت تأثیر قرار داد که با افزایش دوز نسبت به شاهد کاهش معنی‌داری یافت (Jun et al.,

#### مواد و روش‌ها

در اواخر مرداده ماه ۱۳۹۵ بنه‌های سالم و توپر زعفران از مزرعه‌ای در شهرستان سرایان (۱۰' ۳۲' ۵۸° شرقی و ۴' ۵۱' ۳۳° شمالی) واقع در استان خراسان جنوبی برداشت و به دانشکده کشاورزی دانشگاه بیرجند منتقل گردیدند. بنه‌های سالم براساس اندازه مرتب و بنه‌های سالم با وزن بیش از ۸ گرم انتخاب شدند. پس از حذف لایه تونیکا از روی بنه و شستشوی آنها، بنه‌ها مدت یک

مناسب پیشنهاد کردند (Jun et al., 2006). بطور کلی، القای جهش یکی از راه‌های مؤثر در ایجاد تنوع ژنتیکی در اصلاح گیاهان است. جهش نقش مهمی در ایجاد تغییرات جدید در گیاهان با تکثیر رویشی ایفا کرده است. بنابراین، جهش می‌تواند بستری را برای القاء تنوع ژنتیکی در زعفران برای استفاده در نسل‌های بعد ایجاد کند (Seifati et al., 2021). به علت تریپلوئیدی، عقیم بودن و تنوع ژنتیکی کم در زعفران، برای افزایش تنوع آن می‌توان از جهش‌زاهای فیزیکی از قبیل اشعه گاما استفاده کرد. استفاده از روش‌های جهش‌زایی روی افزایش کمیت و کیفیت محصول و در ضمن نرخ تکثیر بنه در زعفران می‌تواند مؤثر باشد که منجر به افزایش ثبات اقتصادی کشاورزان، در دسترس بودن مقدار قابل توجهی بنه و افزایش عملکرد بنه‌های زعفران شود. قدم اول در این زمینه آزمون حساسیت به دوز اشعه می‌باشد. بنابراین، هدف از این تحقیق آزمون حساسیت به دوزهای مختلف اشعه گاما در دو شرایط تیمار سرمای و بدون تیمار سرمای بنه‌های زعفران بود. همچنین در این تحقیق به منظور بررسی تنوع ژنتیکی زعفران‌های پرتوتابی شده و شناسایی جهش‌یافته‌های احتمالی زعفران از نشانگرهای مولکولی استفاده شد.

در پژوهشکده کشاورزی هسته‌ای کرج پرتودهی شدند. پس از اتمام پرتودهی، بنه‌های تیمار شده (برای هر دوز ۱۵۰ بنه برای سه تکرار) در آزمایشی بصورت فاکتوریل با دو فاکتور پیش تیمار سرمایی (در دو سطح بنه‌های سرما ندیده و سرمادیده) در (تعداد کل بنه‌های جوانه زده بر تعداد کل بنه‌های زعفران کشت شده در هر واحد آزمایشی ضرب در ۱۰۰) و شاخص جوانه زنی از رابطه زیر محاسبه شد.

$$SI = \frac{\sum n_x \times d_x}{N}$$

$\sum n_x$  = مجموع تعداد بنه جوانه زده،  $d_x$  = روز جوانه‌زنی بنه،  $N$  = تعداد کل بنه بودند.

نرخ جوانه زنی از رابطه زیر محاسبه گردید.

$$SR = \frac{SI}{SP(0 - 1)}$$

خصوصیات مورفولوژیکی مانند ارتفاع بوته، وزن خشک برگ‌ها در هر واحد آزمایشی در سال اول، و صفات مربوط به عملکرد گل مانند متوسط طول کلاله، وزن خشک کلاله، تعداد بنه‌های دختر، وزن کل بنه‌ها و متوسط وزن بنه در سال دوم اندازه‌گیری

ماه تحت پیش تیمار سرمایی جهت شکستن خواب درون یخچال با دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. بخشی از بنه‌ها که تیمار سرمایی نشدند در دمای اتاق تا زمان پرتوتابی نگهداری شدند. در اوایل مهرماه بنه‌های زعفران با اشعه گاما از چشمه  $Co^{60}$  در دوزهای مختلف دوزهای مختلف اشعه گاما (۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰ و ۲۵ گری به همراه شاهد پرتوندیده) در قالب طرح بلوکهای کامل تصادفی در سه تکرار در باغ دانشکده کشاورزی دانشگاه بیرجند (۱۴' ۱۴" شرقی و ۵۹' ۱۸" شمالی) در مساحت ۳۰ متر مربع کشت شدند. کشت در داخل جعبه‌های پلاستیکی مشبک به ابعاد ۲۳×۳۰×۴۸ سانتی-متر انجام شد بطوری که ابتدا به میزان ۵ سانتی‌متر خاک در کف هر جعبه پلاستیکی ریخته شد. سپس در هر جعبه ۵۰ عدد بنه بطور منظم درون جعبه‌ها چیده شدند و حدود ۱۵ سانتی‌متر مخلوط خاک و کود حیوانی به نسبت ۵۰ درصد (وزنی/وزنی) روی آنها قرار گرفت. سپس جعبه‌ها در داخل خاک طوری مستقر شدند که هم‌تراز با سطح مزرعه گردیدند. محلول پاشی کود کامل مایع زعفران (زرگل شیمی) همراه آب آبیاری نیز سه مرتبه به فاصله دو هفته یکبار صورت گرفت. خصوصیات رشدی مانند متوسط تعداد جوانه‌های سبز شده، درصد جوانه‌زنی شدند.

جدول ۱- نمونه‌های زعفران مورد استفاده برای بررسی تنوع ژنتیکی، نمونه‌های شاهد با علامت C (C1 و C2 به ترتیب برای شاهد سرمادیده و سرما ندیده) و نمونه‌های تیمار شده با دوز اشعه با علامت T و شماره بعد از آن از چپ به راست به ترتیب دوز اشعه برحسب گری، کد سرمادهی و شماره بلوک (تکرار) می‌باشند.

**Table 1- Saffron samples used for genetic diversity analysis, control samples marked with C (C1 and C2 for cold and non-cold storage, respectively) and the treated samples marked with T along with numbers representing radiation dose, cold storage and block number, respectively.**

شماره Number	کد نمونه Sample code	شماره Number	کد نمونه Sample code	شماره Number	کد نمونه Sample code
1	T10-1-1	11	T5-2-3	21	T10-2-3
2	C2	12	T5-2-1	22	T15-2-3
3	T15-1-1	13	T10-1-3	23	T20-1-3
4	C1	14	T5-1-1	24	T20-2-1
5	T10-1-2	15	T15-1-3	25	T10-2-2
6	T5-1-2	16	T25-1-2	26	T25-2-3
7	T5-1-3	17	T15-2-1	27	T20-1-1
8	T15-1-2	18	T25-2-1	28	T20-1-2
9	T5-2-2	19	T25-1-1	29	T20-2-2
10	T15-2-2	20	T10-2-1	30	T20-2-3

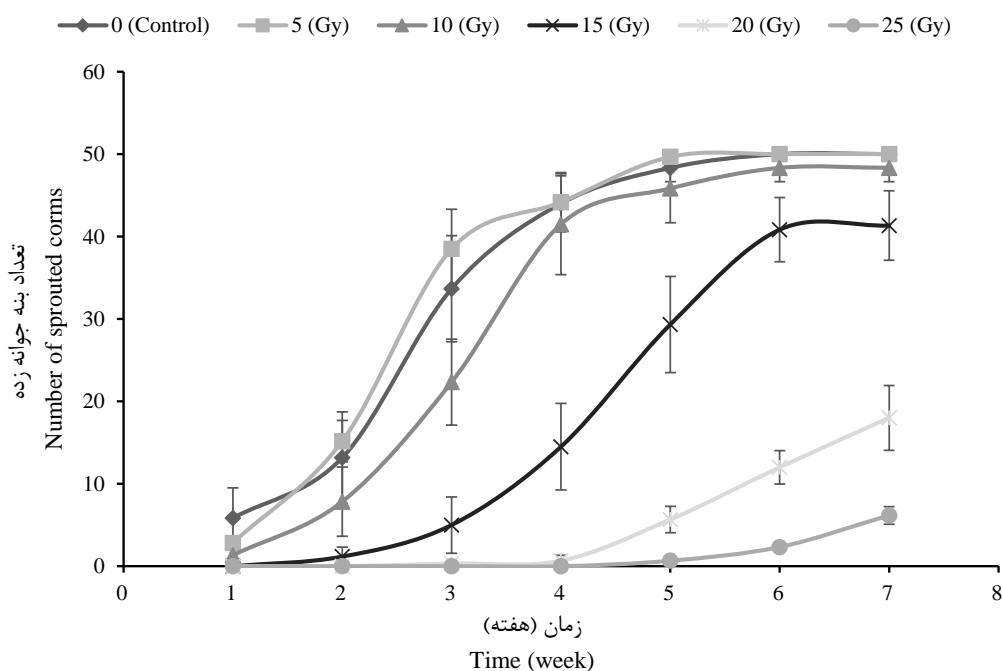
براساس خصوصیات رشدی توسط نرم افزار SigmaPlot با استفاده از مدل لجستیک چهار پارامتری ترسیم و میزان LD<sub>50</sub> براساس مدل برآورد گردید. اطلاعات حاصل از رتبه-بندی نوارهای تکثیر یافته از آغازگرهای RAPD و ISSR به صورت ماتریس صفر (عدم وجود باند) و یک (وجود باند) بدست آمد. تجزیه خوشه‌ای و ترسیم دندروگرام به روش UPGMA و براساس ضرایب تشابه جاکارد با استفاده از نرم افزار NTSYS 2.2 انجام شد.

### نتایج و بحث

تعداد و روند جوانه زنی بنه‌های زعفران با افزایش دوز کاهش یافت، بطوری که دوز ۵ و ۱۰ گری اشعه گاما در هفته‌های متوالی پس از کاشت برابر شاهد بوده اما دوز ۱۵ گری کاهش متوسط سرعت سبز شدن را نسبت به شاهد نشان داد، در حالی که دوز ۲۰ و ۲۵ گری با اختلاف معنی‌داری نسبت به شاهد کاهش شدید سرعت جوانه‌زنی را در هفته‌های متوالی پس از کاشت نشان دادند (شکل ۱). بطور کلی، تیمار اشعه گاما توانست سرعت سبز شدن را تحت تأثیر قرار داده و با افزایش دوز اشعه، سرعت و تعداد بنه‌های جوانه زده کاهش یافت. در مطالعه‌ای که خان (Khan, 2006) جهت القای تنوع از طریق جهش‌زایی القایی برای توسعه کلالة زعفران انجام داد، نشان داده شد که اشعه گاما باعث کاهش سرعت رشد در دوزهای بالاتر از ۲۰ گری شده است که با نتایج این تحقیق مطابقت دارد. همچنین جان و همکاران (Jun et al., 2006) به منظور بررسی تأثیر اشعه گاما بر روی رشد زعفران با اعمال تابش دوزهای ۰ تا ۲۵ گری گزارش کردند که سرعت رشد با افزایش دوز نسبت به شاهد کاهش معنی‌داری یافت.

در سال اول جهت بررسی‌های مولکولی، نمونه‌های برگی از هر واحد آزمایشی جمع‌آوری (جدول ۱) و DNA آنها با استفاده از روش CTAB استخراج شد (Doyle & Doyle, 1987). کمیت و کیفیت DNA استخراج‌شده با استفاده از دستگاه نانودراپ و الکتروفورز ژل آگارز یک درصد تعیین شد. برای انجام این آزمایش از ۶ آغازگر RAPD و ۵ آغازگر ISSR دارای نوار چندشکل استفاده گردید (جدول ۴). دلیل استفاده از این دو سیستم نشانگری، امکان تولید تعداد بالای نوار تکثیر شده و احتمال یافتن نوارهای چندشکل بیشتر بود. مخلوط PCR با حجم نهایی ۱۵ میکرولیتر شامل ۱ میکرولیتر DNA الگو (۳۰ نانوگرم)، ۱ میکرولیتر آغازگر (با غلظت ۱۰ پیکومول)، ۵/۵ میکرولیتر آب دو بار تقطیر و ۷/۵ میکرولیتر مستر PCR آماده بود. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با استفاده از دستگاه ترموسایکلر در چرخه حرارتی برای نشانگر RAPD شامل واسرشت سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۴ دقیقه سپس ۳۵ دوره واسرشت سازی در ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۱ دقیقه، اتصال در دمای ۳۵ درجه سانتیگراد به مدت ۱ دقیقه، و بسط در ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۲ دقیقه اعمال و مرحله بسط نهایی در ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۶ دقیقه انجام شد. چرخه حرارتی برای نشانگر ISSR همانند چرخه حرارتی نشانگر RAPD با این تفاوت که در مرحله اتصال دمای مناسب آغازگر (۴۸ تا ۶۶ درجه سانتیگراد) انجام شد. محصولات حاصل از واکنش‌های PCR با استفاده از ژل آگارز ۱/۵ درصد در بافر 0.5x (TBE) الکتروفورز و پس از رنگ‌آمیزی ژل با اتیدیوم بروماید توسط دستگاه ژل داک تصویر برداری شد.

تجزیه واریانس داده‌ها و مقایسه میانگین به روش LSD محافظت شده در سطح احتمال ۵ درصد توسط نرم افزار GenStat انجام شد. منحنی آزمون حساسیت به اشعه نیز ۰ تا ۲۵ گری گزارش کردند که سرعت رشد با افزایش دوز نسبت به شاهد کاهش معنی‌داری یافت.



شکل ۱- روند رشد بنه‌های تیمار شده در دوزهای مختلف اشعه گاما در طی زمان (هفته)

Figure 1- Growth trend of corms treated at different doses of gamma rays over time (weeks)

بوته نشان داد که دوز ۵ گری تفاوت معنی‌داری با شاهد نداشت و به ترتیب با افزایش دوز اشعه گاما از ۵ تا ۲۵ گری کاهش معنی‌داری نسبت به شاهد نشان داد، بطوری‌که دوز ۱۰ گری کمترین (۴/۱۷ سانتی‌متر) و دوز ۲۵ گری بیشترین (۲۹/۵۷ سانتی‌متر) اختلاف را نسبت به شاهد داشت (جدول ۳). اثر متقابل تیمار اشعه گاما در تیمار سرمایی نشان داد که ارتفاع بوته در دوز ۲۰ گری کاهش معنی‌داری در تیمار سرمایی نسبت به تیمار فاقد سرما داشت (شکل ۲ الف).

مقایسه میانگین اثر متقابل اشعه گاما و سرما بر نرخ جوانه‌زنی (SR) نشان داد که افزایش دوز اشعه گاما در تمام ترکیب‌های تیماری سرمادیده نسبت به شاهد کاهش معنی‌داری داشت بطوری‌که دوز ۵ گری بیشترین (۶۸/۲۸) و دوز ۲۵ گری کمترین (۳/۹۵) نرخ جوانه‌زنی را داشتند. همچنین افزایش دوز اشعه گاما در تمام ترکیب‌های تیماری سرما ندیده به جز دوز ۵ گری که (۶۲/۶۳) است نسبت به شاهد کاهش معنی‌داری داشت (شکل ۲ ب).

نتایج تجزیه واریانس صفات نشان داد که اثرات اصلی تیمار اشعه گاما بر روی تمامی صفات مورد مطالعه در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود، در حالی‌که اثر اصلی تیمار سرما بر روی صفات متوسط ارتفاع بوته، نرخ جوانه‌زنی و متوسط وزن بنه در سطح احتمال یک درصد و برای تعداد بنه در هر کرت در سطح احتمال پنج درصد معنی‌دار شد. اثر متقابل سرما و اشعه گاما بر روی صفات نرخ جوانه‌زنی و متوسط ارتفاع بوته نیز در سطح احتمال یک درصد و برای تعداد بنه دختری در سطح احتمال پنج درصد معنی‌دار بود. بطور کلی، نتایج تجزیه واریانس اثر اصلی فاکتورهای سرما، اشعه و اثر متقابل آنها بر صفات رشدی و مورفولوژیکی بنه‌های زعفران نشان داد که اشعه گاما نسبت به سرما توانست تعداد صفات بیشتری را تحت تأثیر قرار دهد (جدول ۲).

مقایسه میانگین اثر متقابل اشعه گاما و سرما بر متوسط ارتفاع بوته نشان داد که افزایش دوز اشعه گاما در ترکیب‌های مختلف تیمار سرمایی، کاهش معنی‌داری نسبت به شاهد داشته است، بطوری‌که بنه‌های سرما ندیده دوز ۵ گری بیشترین (۳۴/۱۳ سانتی‌متر) و سرما ندیده دوز ۲۵ گری کمترین (۳/۸۰ سانتی‌متر) ارتفاع بوته را نشان دادند. مقایسه میانگین سطوح مختلف اشعه گاما (دوز) بر متوسط ارتفاع

جدول ۲- تجزیه واریانس اثر تیمارهای سرما و اشعه گاما بر برخی صفات مختلف رشدی و مورفولوژیکی زعفران

Table 2. Analysis of variance of the effects of cold and gamma irradiation treatments on some growth and morphological traits of saffron

منابع تغییرات Source of variations	درجه آزادی Degree of freedom	متوسط ارتفاع Average height	نرخ جوانه‌زنی Sprouting rate	درصد جوانه‌زنی Sprouting percentage	شاخص جوانه‌زنی Sprouting Index	وزن خشک گیاه Plant dry weight	تعداد بینه دختری Number of daughter combs	وزن کل بینه های دختری Total weight of daughter combs	متوسط وزن بینه Average comb weight	میانگین مربعات Mean square	
										میانگین مربعات	میانگین مربعات
بلوک Block	2	17.99*	231.08*	190.3 <sup>ns</sup>	21.39 <sup>ns</sup>	16.94 <sup>ns</sup>	0.1248 <sup>ns</sup>	11119 <sup>ns</sup>	0.0228*		
سرما Cold	1	138.85**	873.33**	205.4 <sup>ns</sup>	4.40 <sup>ns</sup>	0.11 <sup>ns</sup>	0.3185*	10885 <sup>ns</sup>	0.0424**		
دوز گاما Gamma dose	5	854.30**	4628.59**	5107.7**	923.34*	375.40**	3.2126**	191350**	0.0864**		
سرما*دوز گاما Cold*Gamma Dose	5	68.16**	327.69**	205.4 <sup>ns</sup>	18.55 <sup>ns</sup>	19.18 <sup>ns</sup>	0.19165*	2443 <sup>ns</sup>	0.0037 <sup>ns</sup>		
خطا Error	22	8.82	49.82	108.2	8.27	15.05	0.05413	5564	0.0052		
CV (%)		13.2	18.5	12.7	13.4	32.3	13.5	34.3	13.4		

\* و \*\*: به ترتیب معنی‌دار در سطوح احتمال ۵ و ۱ درصد و ns غیر معنی‌دار

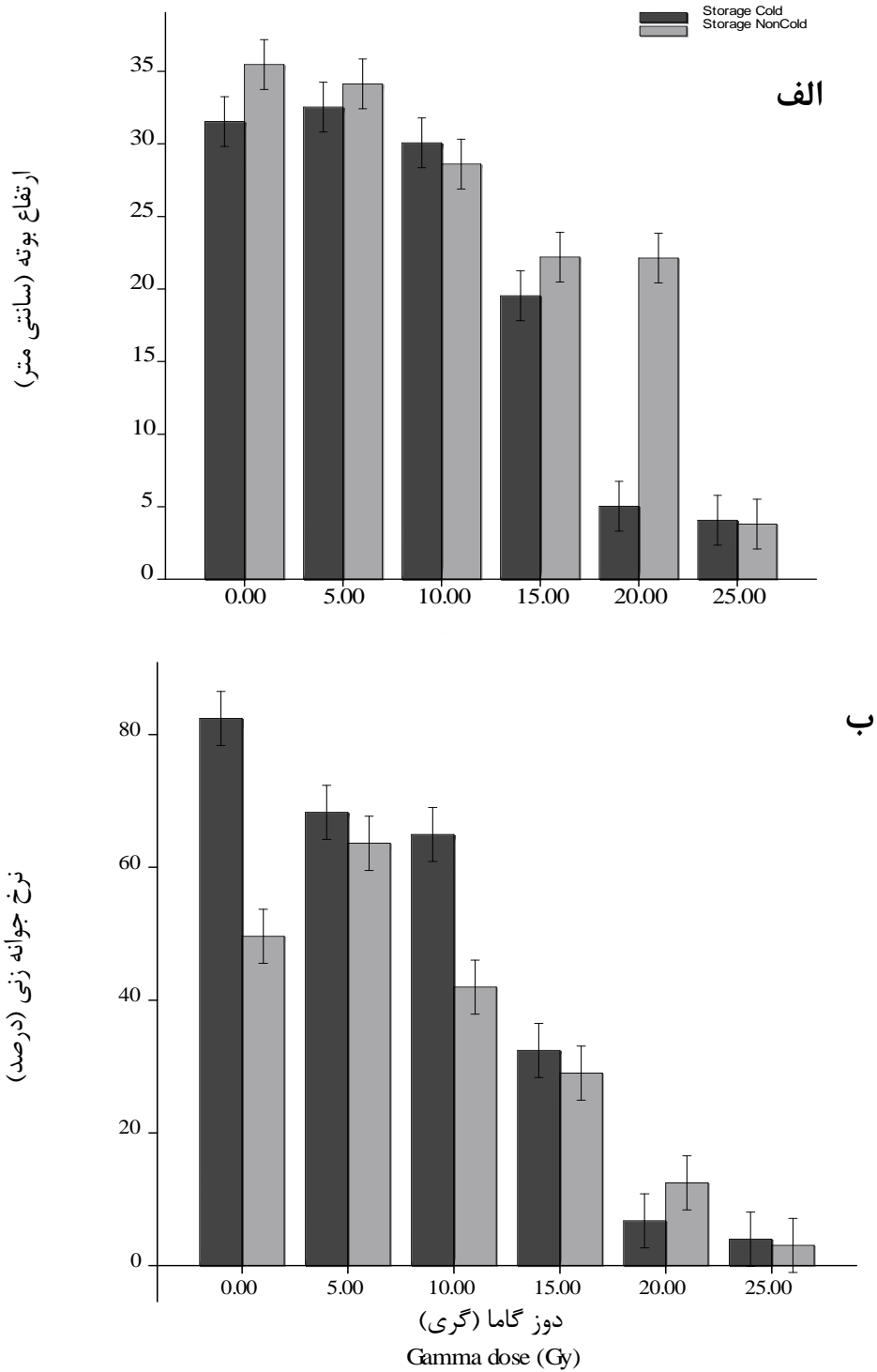
\* and \*\*: Significant at 5 and 1 percent significant level, respectively, ns: represent non-significant

جدول ۳- مقایسه میانگین برخی صفات رشدی و مورفولوژیکی زعفران برای اثرات ساده تیمرهای سرما و اشعه گاما

Table 3. The mean comparison of some growth and morphological traits of saffron for the main effects of cold and gamma irradiation treatments

تیمبر	متوسط ارتفاع Average height (cm)	وزن خشک گیاه (گرم) Plant dry weight (g)	نرخ جوانه‌زنی Sprouting rate (%)	درصد جوانه‌زنی Sprouting percentage (%)	شاخص جوانه‌زنی Sprouting Index	تعداد بنه دختری Number of daughter corms	وزن کل بنه های دختری Total weight of daughter corms (g)	متوسط وزن بنه Average corm weight (g)
0 (شاهد)	33.50 <sup>a</sup>	19.83 <sup>a</sup>	66.03 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>	32.02 <sup>a</sup>	216.8 <sup>a</sup>	379 <sup>a</sup>	1.914 <sup>bc</sup>
5	33.33 <sup>a</sup>	19.33 <sup>a</sup>	65.95 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>	32.47 <sup>a</sup>	157.3 <sup>b</sup>	408.7 <sup>a</sup>	2.77 <sup>a</sup>
10	29.33 <sup>b</sup>	17.08 <sup>a</sup>	53.45 <sup>b</sup>	100 <sup>a</sup>	30.15 <sup>a</sup>	150.7 <sup>bc</sup>	335.3 <sup>a</sup>	2.36 <sup>ab</sup>
15	20.87 <sup>c</sup>	10.08 <sup>b</sup>	30.70 <sup>c</sup>	98.21 <sup>a</sup>	23.13 <sup>b</sup>	99.2 <sup>c</sup>	136.7 <sup>b</sup>	1.285 <sup>cd</sup>
20	13.58 <sup>d</sup>	3.08 <sup>c</sup>	9.59 <sup>d</sup>	57.67 <sup>b</sup>	9.21 <sup>c</sup>	34.2 <sup>d</sup>	44.2 <sup>c</sup>	0.935 <sup>de</sup>
25	3.93 <sup>e</sup>	2.58 <sup>c</sup>	3.49 <sup>d</sup>	33.33 <sup>c</sup>	3.88 <sup>d</sup>	1.2 <sup>d</sup>	2.2 <sup>c</sup>	0.31 <sup>e</sup>
LSD <sub>0.05</sub>	3.56	4.65	8.45	12.45	3.44	54.15	89.30	0.77
سرما دیده Cold storage	20.46 <sup>b</sup>	11.94	43.10 <sup>a</sup>	79.40	22.16	108.3	200	1.32 <sup>b</sup>
سرما ندیده Non-cold storage	24.39 <sup>a</sup>	12.06	33.30 <sup>b</sup>	84.20	21.46	111.5	235	1.87 <sup>a</sup>
LSD <sub>0.05</sub>	2.05	2.68	4.88	7.19	1.99	31.26	51.60	0.44





شکل ۲- میانگین اثر متقابل سطوح سرما و اشعه گاما بر الف) متوسط ارتفاع بوته و ب) نرخ جوانه‌زنی

Figure 2- Mean interaction of cold and gamma rays on (a) average plant height and (b) sprouting rate

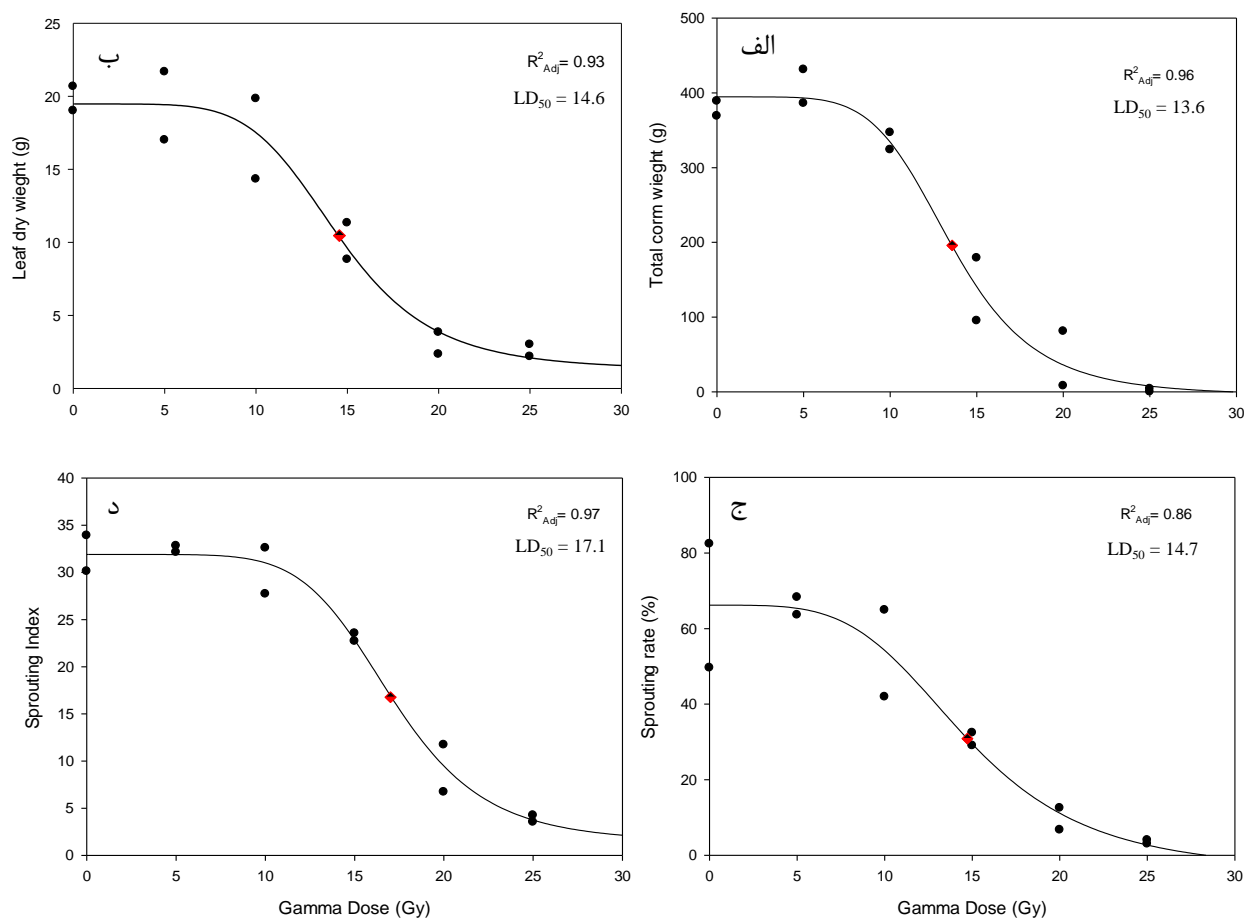
می‌شود، یا بدون ترمیم و یا با ترمیم اشتباه باعث مرگ سلول، آسیب کروموزومی یا سلول جهش‌یافته می‌شود (Lawrence *et al.*, 1971). تابش اشعه گاما همچنین می‌تواند بر مورفولوژی، آناتومی، بیوشیمی و فیزیولوژی گیاهان تأثیر گذاشته و منجر به تغییراتی در رشد و نمو گیاه شود. در این مطالعه با افزایش دوز اشعه گاما، درصد و نرخ جوانه زنی، وزن خشک برگ، ارتفاع بوته، تعداد و وزن بنه‌های دختری کاهش یافت. کاهش شدید در دوزهای بالا ممکن است نتیجه خسارت فیزیکی اشعه (Nwachukwu *et al.*, 2009) به بنه‌ها یا ناشی از شکستگی DNA سلولها (Rastegari *et al.*, 2007) و اختلال در مسیرهای متابولیکی دخیل در فرآیند جوانه زنی و رشد باشد (Ndofunsu *et al.*, 2015).

#### نمودار حساسیت به اشعه گاما

با توجه به نمودار حساسیت به اشعه براساس صفات وزن کل بنه‌ها، وزن خشک برگ‌ها، شاخص و نرخ جوانه‌زنی بنه‌های زعفران با اعمال سطوح مختلف تیمار اشعه گاما، مقدار  $LD_{50}$  به ترتیب برابر  $13/6$ ،  $14/6$ ،  $14/7$  و  $17/1$  گری بود (شکل ۳). بطورکلی می‌توان محدوده‌ی دوزی ۱۳ تا ۱۷ گری را مناسب اعمال تیمار اشعه پیشنهاد نمود. خان و همکاران (۲۰۱۱) دوز ۲۰ گری را مناسب‌ترین دوز اشعه گاما و دوز  $LD_{50}$  در بنه‌های زعفران یکنواخت با وزن ۱۰ گرم در شرایط کشت مزرعه‌ای گزارش کردند، در حالی‌که رستگاری و همکاران (Rastegari *et al.*, 2007) دوزهای پرتو گاما کمتر از ۱۰ گری را روی بنه‌های درحال خواب کشت شده در شرایط مزرعه‌ای پیشنهاد نمودند.

مقایسه میانگین سطوح مختلف دوز اشعه گاما بر وزن خشک گیاه نشان می‌دهد که دوز ۵، ۱۰ گری از اشعه گاما تفاوت معنی‌داری با شاهد نداشته و در یک گروه قرار می‌گیرند، دوز ۱۵، ۲۰ و ۲۵ گری کاهش معنی‌داری نسبت به شاهد داشت. افزایش دوز اشعه گاما ۵ و ۱۰ گری در ترکیب‌های تیماری سرمادیده و سرماندیده اختلاف معنی‌داری با شاهد نداشته و دوز ۱۵، ۲۰ و ۲۵ گری کاهش معنی‌داری نسبت به شاهد داشت، بطوری‌که دوز ۱۵ گری کاهش متوسط ( $11/33$  گرم) و دوز ۲۰ گری سرمادیده و ۲۵ گری به ترتیب کمترین مقدار اشعه گاما بر درصد جوانه زنی نشان می‌دهد که دوز ۵، ۱۰ و ۱۵ گری از اشعه گاما تفاوت معنی‌داری با شاهد نداشته و در یک گروه قرار گرفتند، دوزهای ۲۰ و ۲۵ گری کاهش معنی‌داری نسبت به شاهد داشته است بطوری‌که دوزهای ۲۰ و ۲۵ گری به ترتیب مقدار ( $42/33$ ) و ( $66/67$ ) اختلاف را نسبت به شاهد نشان دادند (جدول ۳). مقایسه میانگین دوزهای مختلف اشعه گاما بر شاخص سبزی‌نگی نشان داد که دوز ۵ و ۱۰ گری از اشعه گاما تفاوت معنی‌داری با شاهد نداشت. با افزایش دوز اشعه گاما از ۱۵ تا ۲۵ گری کاهش معنی‌داری نسبت به شاهد داشت بطوری‌که دوز ۱۵ گری کمترین مقدار ( $8/89$ ) و دوز ۲۵ گری ( $28/14$ ) بیشترین مقدار اختلاف را از شاهد داشت (جدول ۳).

پروتوئابی نیز همانند سایر تنش‌های محیطی باعث ایجاد رادیکال‌های آزاد شیمیایی و تشکیل گونه‌های اکسیژن فعال با اثرات مستقیم و غیر مستقیم شده و نهایتاً این رادیکال‌های آزاد منجر به تغییر در سلول‌های گیاهی خسارت می‌شود (Beyaz & Yildiz, 2017). در مرحله‌ی متابولیکی، تغییر ایجاد شده در سلول‌ها یا ترمیم شده و سلول‌های نرمال ایجاد



شکل ۳- نمودار لجستیک برای برآورد مقادیر LD<sub>50</sub> براساس صفات رشدی و مورفولوژیکی در بنه‌های زعفران، الف-د) نمودار برآورد LD<sub>50</sub> به ترتیب برای صفات وزن کل بنه‌های دختر، وزن خشک برگها، نرخ جوانه زنی و شاخص جوانه زنی است. علامت (♦) نشاندهنده نقطه LD<sub>50</sub> است.

Figure 3- Logistic diagram for estimating LD<sub>50</sub> values based on growth and morphological traits in saffron corms, (a to d) Estimation of LD<sub>50</sub> for total corm weight, leaf dry weight, sprouting rate, and sprouting index, respectively. Mark (♦) indicates the LD<sub>50</sub> point.

### بررسی تنوع ژنتیکی

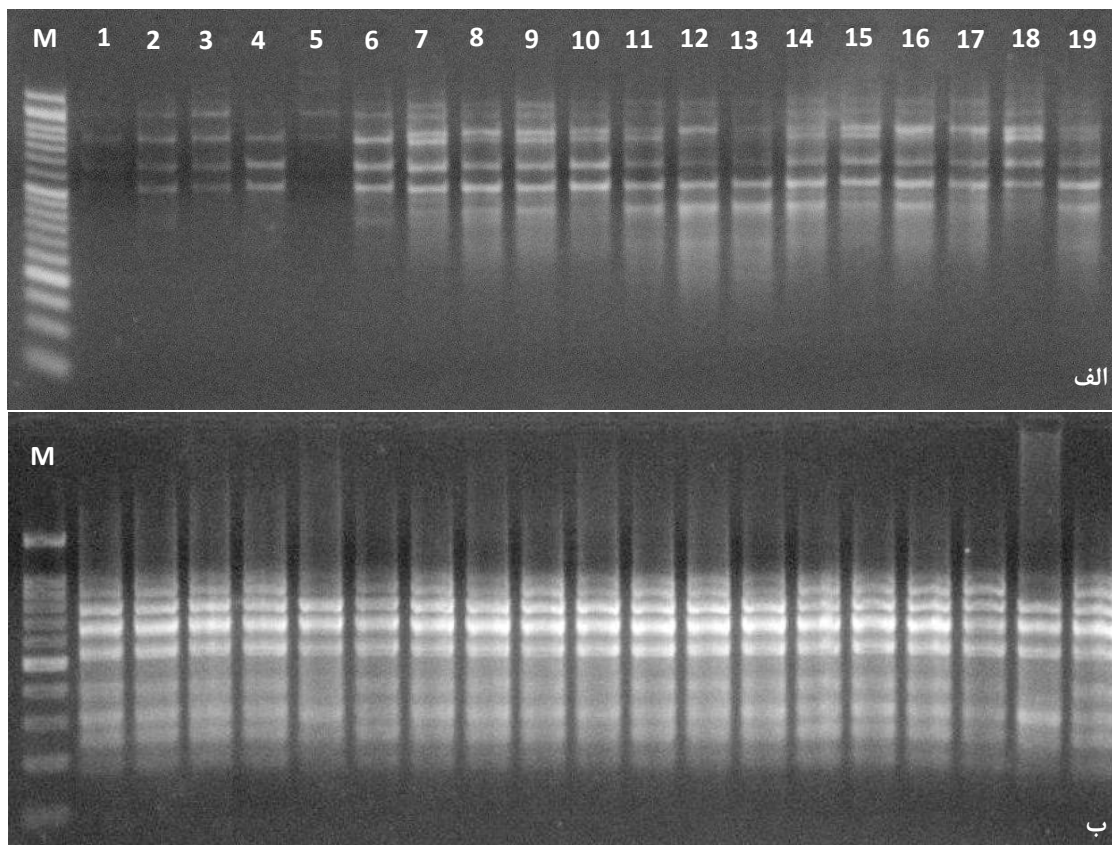
از تعداد ۸ آغازگر RAPD مورد استفاده در مرحله غربالگری آغازگرهای چندشکل، در نهایت ۶ آغازگر که چندشکلی نشان دادند و دارای تعداد قطعات تکثیر شده بیش‌تر و با وضوح بالایی بودند (شکل ۴ الف)، مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند (جدول ۲). از مجموع ۶ آغازگر RAPD بکار رفته در این تحقیق، تعداد ۳۴ قطعه تکثیر شد که از وضوح بالایی برخوردار بوده و اندازه طول آن‌ها بین ۵۰ تا ۱۵۰۰ جفت باز بود. از مجموع نوارهای تشکیل شده، تعداد ۲۳ نوار چندشکل و ۱۱ نوار نیز مونومورف بودند. به‌طور متوسط تعداد ۶/۵ نوار به ازای هر آغازگر بدست آمد. بیشترین و کمترین درصد چندشکلی به ترتیب در آغازگر OP11 (۱۰۰٪) و آغازگر OP6 (۴۳٪) مشاهده شد. از تعداد ۸ آغازگر ISSR مورد استفاده در مرحله غربالگری آغازگر، نیز در نهایت ۵ آغازگر که تعداد

قطعات تکثیر شده بیش‌تر و با وضوح بهتر داشتند، استفاده شدند (جدول ۴). از مجموع ۵ آغازگر ISSR بکار رفته، تعداد ۲۵ قطعه تکثیر شد که از وضوح بالایی برخوردار بوده و اندازه طول آن‌ها بین ۱۰۰ تا ۱۵۰۰ جفت باز بودند، رتبه بندی و برای تجزیه و تحلیل بکار گرفته شدند. از مجموع نوارهای شمارش شده برای نمونه‌های مختلف، تعداد ۱۶ نوار چندشکلی نشان دادند و ۹ نوار نیز مونومورف بودند. به‌طور متوسط، تعداد ۵ نوار به ازای هر آغازگر ISSR بدست آمد که تعداد ۲/۳ نوار از آنها چندشکل بودند. کمترین نوار تکثیر شده توسط آغازگر ISSR51 با تعداد ۲ نوار و بیشترین تعداد نوار تکثیر شده توسط آغازگر ISSR7 به تعداد ۱۰ نوار (شکل ۴ ب) حاصل گردید. کمترین و بیشترین درصد چندشکلی به ترتیب در آغازگر ISSR7 (۴۰٪) و آغازگرهای ISSR4 و ISSR51 (۱۰۰٪) مشاهده شد.

جدول ۴- خصوصیات آغازگرهای RAPD و ISSR مورد استفاده در آزمایش

Table 4- Characteristics of the RAPD and ISSR primers used in the experiment

آغازگر Primer	توالی (۵'→۳') Sequence (5'-3')	تعداد نوارهای تکثیر شده Number of amplified bands	تعداد نوارهای چندشکل Number of polymorphic bands	درصد چندشکلی Polymorphic percentage
OP5	AGGGGTCTTG	6	4	60
OP6	GGTCCCTGAC	7	3	43
OP11	CAATCGCCGT	7	7	100
OP17	TCGCATCCAG	5	3	60
OP18	AGGTGACCGT	4	2	50
OP19	ACACCGARGG	5	4	80
ISSR3	5'-(AG)8RC-3'	6	5	83
ISSR4	5'-(AG)8YT-3'	3	3	100
ISSR5	5'-(TC)9C-3'	4	2	50
ISSR7	5'-(AG)8T-3'	10	4	40
ISSR51	5'-(RT)8AC-3'	2	2	100



شکل ۴- الگوی نواری حاصل از تکثیر DNA ژنومی نمونه‌های زعفران تیمار شده با دوزهای مختلف اشعه گاما همراه با شاهد توسط الف) آغازگر رپید OP19، و ب) آغازگر M.ISSR7 نشانگر اندازه DNA الف) ۵۰ جفت بازی وب) ۱۰۰ جفت بازی است

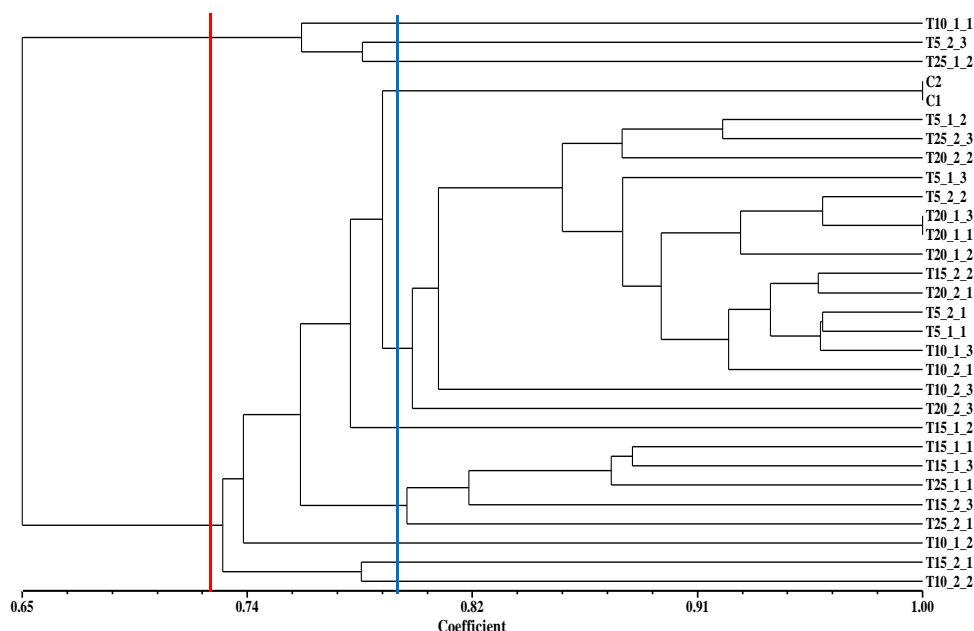
**Figure 4- Band pattern of genomic DNA amplification of saffron samples treated with different doses of gamma ray along with control; (a) OP19 RAPD primer, and b) ISSR7 primer. M represents the DNA size marker of (a) 50 bp and b) 100 bp**

در مطالعه‌ای جهش‌زایی درون شیشه با استفاده از اشعه گاما (۱۰ تا ۵۰ گری) برای گزینش لاین‌های مقاوم به شوری در نیشکر (*Saccharum officinarum* L.) انجام شد. تعیین خصوصیات مولکولی با استفاده از نشانگر RAPD، چندشکلی ژنتیکی را بین لاین‌های مقاوم گزینش شده و گیاهان شاهد نشان داد (Patade et al., 2008). در برنامه جهش‌زایی درون شیشه گیاه تارو (*Colocasia esculenta* L.) برای بهبود مقاومت به بیماری قارچی نوک شاخه انتهایی در معرض دوزهای مختلف اشعه گاما قرار گرفت که دوز مؤثر LD<sub>30</sub> در آن ۷/۶۵ گری تعیین شد و در آزمایش از هشت آغازگر RAPD برای بررسی تنوع ژنتیکی استفاده شد که نتایج تجزیه خوشه‌ای براساس الگوریتم UPGMA تنوع ژنتیکی

نتایج حاصل از تجزیه خوشه‌ای براساس ماتریس ضرایب تشابه جاکارد و الگوریتم UPGMA برای گروه‌بندی نمونه‌های جهش یافته زعفران نشان داد که بین نمونه‌های پرتودیده و شاهد تنوع وجود داشت. نمونه‌های T10\_1\_1 (سرماندیده، دوز ۱۰ گری)، T5\_2\_3 (سرماندیده، دوز ۵ گری) و T25\_1\_2 (سرماندیده، دوز ۲۵ گری) کاملاً متمایز از دیگر نمونه‌ها در یک گروه قرار گرفتند و دارای بیشترین فاصله ژنتیکی با شاهد (پرتوتابی نشده) و نمونه‌های دیگر بودند. شاهد‌ها (C1 و C2) کاملاً مشابه بودند، درحالی‌که نمونه‌های پرتو دیده دیگر در زیرگروه‌های متفاوتی از شاهد‌ها قرار گرفتند (شکل ۵).

نشانه‌گر RAPD و ISSR نشان داد که این نشانگرها در شناسایی نواحی چند شکلی و شناسایی جهش‌یافته‌ها می‌توانند مفید باشند. بنابراین به نظر می‌رسد این نشانگرهای مولکولی را می‌توان به عنوان ابزاری مفید در بررسی تنوع ژنتیکی و غربال جهش یافته‌ها همچنین برای گزینش نمونه‌های مختلف زعفران جهش یافته مورد استفاده قرار داد.

پایینی را بین نمونه‌های جهش یافته نشان داد ( *Seetohul et al., 2007*). در این آزمایش نیز با توجه به اطلاعات حاصل از نشانگرهای مولکولی و درصد چندشکلی ایجاد شده، همچنین دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای، نشان از وجود تنوع ژنتیکی بین نمونه‌ها مورد مطالعه دارد. به‌طورکلی، بررسی تنوع در نمونه‌های جهش یافته زعفران با استفاده از



شکل ۵- دندروگرام بدست آمده از ۲۸ نمونه جهش یافته زعفران همراه با دو نمونه شاهد (C2 و C1) با استفاده از دو نشانگر ISSR و RAPD. خوشه بندی نمونه‌ها به دو گروه اصلی براساس خط برش قرمز رنگ در ضریب ۰/۷ و تفکیک نمونه‌های شاهد با نمونه‌های پرتودیده براساس خط برش آبی رنگ در ضریب ۰/۸ انجام شد.

**Figure 5- Dendrogram obtained from 28 mutant samples along with two controls (C1 and C2) of saffron using ISSR and RAPD markers. The clustering into two main groups based on the red cut line at a coefficient of 0.7 and the separation of control samples with irradiated samples based on the blue cutting line at a coefficient of 0.8.**

فاکتورهای رشدی و مورفولوژیکی گیاه زعفران را تحت تأثیر قرار داد و در دوز ۵ گری اختلافی با شاهد مشاهده نشد و با شاهد در یک گروه قرار گرفتند و با افزایش دوز اشعه گاما روند کاهشی در اکثر صفات وجود داشت بطوری‌که، دوزهای ۱۰ تا ۲۵ گری کاهش شدیدی را نسبت به شاهد نشان دادند. روند رشد بنه‌های سرمادیده و سرماندیده با افزایش دوز کاهش رشد را داشت که دوز ۵ و ۱۰ گری مشابه شاهد، ۱۵ گری متوسط رشد و ۲۰ و ۲۵ گری کاهش رشد را نشان داد. دوزهای بالاتر

بطورکلی، نتایج تجزیه واریانس و مقایسه میانگین بر روی بررسی صفات رشدی و مورفولوژیکی در سال اول نشان می‌دهد که اثر فاکتور سرما در دو سطح سرمادیده و سرماندیده معنی‌دار شده است. می‌توان گفت که اثر فاکتور سرما در هر دو سطح، فاکتورهای رشدی و مورفولوژیکی گیاه زعفران را تحت تأثیر قرار داد، به‌عبارت‌دیگر اعمال تیمار سرما باعث شد بنه‌های سرمادیده حساسیت بیشتری نسبت به اشعه گاما نشان دهند. اثر فاکتور اشعه گاما نیز در سطوح مختلف و اثرمتقابل نیز

Targeting Induced Limited Lesions in ) TILLING Genomes) برای غربال با توان بالای جهش یافته‌ها نقش خیلی مهمی در برنامه‌های اصلاح جهش ایفا می‌کنند (Shu, 2012; Till et al., 2009; Shu et al., 2009). در این آزمایش بنه‌های سرمادیده و سرماندیده جهت تعیین دوز بهینه تحت تیمار دوزهای مختلف اشعه گاما قرار گرفتند. آزمون حساسیت به اشعه گاما برای صفات نشان داد که، LD<sub>50</sub> در دو سطح سرمادیده و سرماندیده دوز محدوده ۲±۱۵ گری تعیین شد. با بررسی مولکولی با استفاده از نشانگرهای RAPD و ISSR مشخص شد که بین گیاهان شاهد و پرتودیده تنوع ژنتیکی وجود داشت. بنابراین القاء جهش می‌تواند به عنوان روشی قابل اعتماد در ایجاد تنوع و بهبود ژنتیکی زعفران باشد. با توجه به نتایج این آزمایش می‌توان در برنامه‌های آتی اصلاح جهش، جمعیت بزرگی از بنه‌های زعفران را در دوز LD<sub>50</sub> تعیین شده تیمار و مورد بررسی و گزینش قرار داد.

باعث تأخیر در رشد شده است. بنابراین، می‌توان گفت سرما و اشعه گاما سرعت رشد را تحت تأثیر قرار داده است. با افزایش دوز اشعه گاما اکثر صفات مورد مطالعه کاهش نشان دادند، بطوری که بیشترین کاهش در دوزهای ۲۰ و ۲۵ گری رخ داد. بطور کلی، دوزهای بالای ۲۰ گری اثر منفی شدیدی بر خصوصیات رشدی و مورفولوژیکی زعفران‌های پرتودیده داشتند.

یکی از چالش‌ها در اصلاح جهش در زعفران، مشکل در ردیابی جهش یافته‌های احتمالی در نسل‌های بعدی است. لذا پیشنهاد می‌شود که از روش‌های نوین کشت مانند کشت ایروپونیک یا هیدروپونیک (Souret & Weathers, 2000) بنه‌های زعفران استفاده شود تا به راحتی مراحل رشدی دنبال شده و بتوان جهش یافته‌های احتمالی را به سهولت شناسایی و گزینش نمود. علاوه بر این، القاء جهش در ترکیب با فن‌آوری‌های زیستی نظیر کشت بافت (Izanloo et al., 2019; Derakhshan et al., 2021)، نشانگرهای مولکولی و تکنیک

#### منابع

- Beyaz, R., Sancak, C., Yildiz, Ç., Kuşvuran, Ş., Yildiz, M., 2016. Physiological responses of the MI sainfoin (*Onobrychis viciifolia Scop*) plants to gamma radiation. *Applied Radiation and Isotopes* 118, 73-79.
- Beyaz, R., Yildiz, M., 2017. The use of gamma irradiation in plant mutation breeding. *Plant Engineering. InTech*, 33-46.
- Derakhshan, A., Izanloo, A., Alizadeh, Z., Behdani, M. A. 2021. Optimization of embryogenic callus induction and indirect regeneration in saffron (*Crocus sativus L.*). *Journal of Saffron Research* 9(1): 29-44. [in Persian with English summary]
- Donini, P., Sonnino, A., 1998. Induced mutation in plant breeding: current status and future outlook. In: Jain, S.M., Brar, D.S., Ahloowalia, B.S. (Eds.), *Somaclonal variation and induced mutations in crop improvement*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp 255-291.
- Doyle, J.J., Doyle, J.L., 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* 19, 11-15.
- Fernández, J. A., 2004. Biology, biotechnology and biomedicine of saffron. *Recent Research Developments in Plant Science* 2, 127-159.
- Ghorbani, M., 2007. The Economics of Saffron in Iran. *Acta Hort. (ISHS)* 739, 321-331.
- Grilli Caiola, M., Canini, A., 2010. Looking for saffron's (*Crocus sativus L.*) parents. *Functional Plant Science and Biotechnology* 4, 1-14.
- Hemati Kakhki, A., Hosseini, M., Karbasi, A. R., 2009. Study of Socio-economic effects of ten years research on saffron (*Crocus sativus L.*). III International Symposium on Saffron: Forthcoming Challenges in Cultivation, Research and Economics 850, pp. 287-292.
- Izanloo, A., Derakhshan, A., Alizadeh, Z., Behdani, M. A. 2019. Cormlet Production of Saffron (*Crocus Sativus L*) using in vitro Culture Techniques. *Journal of Saffron Research* 6(2): 179-189. [in Persian with English summary]
- Jun, Z., Xiaobin, C., Fang, C., 2006. The effects of Co<sup>60</sup> γ-Irradiation on development of *Crocus sativus L.* II International Symposium on Saffron Biology and Technology 739, pp. 307-311.
- Khan, I.A., 2006. Development of high yielding saffron mutant. II International Symposium on Saffron Biology and Technology 739, pp. 255-257.
- Khan, M.A., Nagoo, S., Naseer, S., Nehvi, F.A., Zargar, S.M., 2011. Induced mutation as a tool for improving corm multiplication in saffron (*Crocus sativus L.*). *Journal of Phytology* 3, 8-10.
- Lawrence, A.M., Pinsky, S.M., Goldfine, I.D., 1971. Conventional radiation therapy in acromegaly: A review and reassessment. *Archives of internal medicine* 128, 369-377.
- 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, tissue and organ culture* 88, 319-327.
- Mahure, H., Choudhary, M., Prasad, K., Singh, S., 2010. Mutation in chrysanthemum through gamma irradiation. *Indian Journal of Horticulture* 67, 356-358.
- Mba, C., Afza, R., Jankowicz-Cieslak, J., Bado, S., Matijevic, M., Huynh, O., Till, B., 2009. Enhancing genetic diversity through induced mutagenesis in vegetatively propagated plants. *Proceedings of International Symposium on Induced Mutations in Plants: Induced Plant Mutations in the Genomics Era*, FAO, pp. 293-296.
- Misra, P., Datta, S.K., Chakrabarty, D., 2003. Mutation in Flower Colour and Shape of Chrysanthemum morifolium Induced by  $\gamma$ -Radiation. *Biologia Plantarum* 47, 153-156.
- Ndofunsu, D., Ndiku, L., Otono, B., Nakweti, K., Mba, C., Till, B., 2015. In vitro gamma radiosensitivity test in Congolese cassava, *Manihot esculenta* Crantz accession. *Academia Journal of Biotechnology* 3, 1-5.
- Nwachukwu, E., Mbanaso, E., Nwosu, K., 2009. The development of new genotypes of the white yam by mutation induction using yam mini-tubers. *Induced Plant Mutations in the Genomics Era*. Rome: FAO, 309-312.
- Patade, V.Y., Suprasanna, P., Bapat, V.A., 2008. Gamma irradiation of embryogenic callus cultures and in vitro selection for salt tolerance in sugarcane (*Saccharum officinarum* L.). *Agricultural Sciences in China* 7, 1147-1152.
- Rastegari, S.J., Vedadi, S., Ghaffari, S.M., 2007. Genetic variation of gamma radiation on immature saffron sprout. *Nuclear Science and Technology* 40, 46-41. [in Persian].
- Seetohul, S., Puchooa, D., Ranghoo-Sanmukhiya, V., 2007. Genetic Improvement of Taro (*Colocasia esculenta* var *esculenta*) through in-vitro mutagenesis. *University of Mauritius Research Journal* 13(1), 79-89.
- Seifati, S. E., Mohit Ardakani, A. M., Izanloo, A., Borzoei, A. 2021. Induced Morpho-physiological variation in Saffron (*Crocus sativus* L.) Using Gamma Radiation. *Journal of Saffron Research* 9(1): 115-129. [in Persian with English summary]
- Shu, Q.Y., Forster, B.P., Nakagawa, H., 2012. Plant mutation breeding and biotechnology. *Joint FAO/IAEA program*, Vienna, Austria.
- Shu, Q. Y., 2009. Turning plant mutation breeding into a new era: molecular mutation breeding. *Proceedings of International Symposium on Induced Mutations in Plants: Induced Plant Mutations in the Genomics Era*, FAO, Rome, 425-427.
- Sisodia, A., Singh, A., 2015. Studies on gamma ray induced mutants in gladiolus. *Indian Journal of Agricultural Sciences* 85(1),79-86.
- Souret, F.F., Weathers, P.J., 2000. The Growth of Saffron (*Crocus sativus* L.) in Aeroponics and Hydroponics. *Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants* 7, 25-35.
- Till, B., Afza, R., Bado, S., Huynh, O., Jankowicz-Cieslak, J., Matijevic, M., Mba, C., 2009. Global TILLING projects. *Proceedings of International Symposium on Induced Mutations in Plants: Induced Plant Mutations in the Genomics Era*, FAO, Rome, 237-239.
- Van Harten, A., Broertjes, C., 1989. Induced mutations in vegetatively propagated crops. *Plant Breeding Review* 6, 55-





Original Article:

## Radiosensitivity Test to Determine the Suitable Dose of Induce Mutation in Saffron (*Crocus sativus L.*)

Fatemeh Jahandar Zaboli<sup>1</sup>, Ali Izanloo<sup>2\*</sup>, Mohammad Ghader Ghaderi<sup>3</sup>, Masoud Rahimi<sup>4</sup>

1- M.Sc. Graduate of Plant Breeding, Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, University of Birjand, Iran.

2- Associate Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, University of Birjand, Birjand, Iran.

3. Assistant of Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, University of Birjand, Iran.

4- Researcher, Agricultural Research Group, Nuclear Agriculture Research Center, Karaj Nuclear Technological Sciences Research Institute, Karaj, Iran.

\* Corresponding Author Email: [a.izanloo@birjand.ac.ir](mailto:a.izanloo@birjand.ac.ir)

Received 31 December 2019; Accepted 13 September 2020

### Abstract

Saffron is a triploid and sterile plant having no or little genetic variation. Mutation induction is a way of increasing genetic diversity in vegetatively propagated plants. The first step in the mutation induction is to perform a radio-sensitivity test for determining the proper dose of gamma ray. Therefore, the aim of this study was to test the sensitivity of different doses of gamma ray in two conditions of cold and non-cold treatment of saffron corms. For this purpose, a factorial experiment with two factors including cold pre-treatment (cold and non-cold) and different doses of gamma ray (0, 5, 10, 15, 20 and 25 Gy) was conducted in a randomized complete block design with three replications. Growth and morphological characteristics such as plant height, number of leaves per plant, leaf dry weight, sprouting rate and percentage in the first year (MV1), and attributes related to daughter corms and flower yield, such as mean height of the stigma and dry weight of the stigma in the second year (MV2) were measured. The results of the study showed that the effect of cold treatment, radiation and their interaction was statistically significant, with the increase in gamma dose, most of the traits decreased significantly compared to the control. The radio-sensitivity test for the mean of plant height and sprouting rate and percentage, corm weight in two levels of pre-cold treatments showed that 50% survival was in the range of  $15 \pm 2$  Gray. According to the radio-sensitivity test, the number of leaves per plant was less susceptible to gamma rays. In order to study the genetic diversity of the gamma-irradiated saffron. The mutated samples of saffron were evaluated using RAPD and ISSR molecular markers. Cluster analysis was performed using the UPGMA method for both marker systems. The results showed that there was polymorphism between the control samples and radiated samples. In general, the results showed that the RAPD and ISSR markers could detect the polymorphic mutants and identify saffron mutants.

**Keywords:** Cold treatment, Genetic variation, Mutation, Molecular marker, Polymorphism.