

## **Determination of the Optimal Dosage of Physical and Chemical Mutagenesis Agents in Callus Tissue of Kiwifruit Leaf**

Hassan Saeiahagh<sup>1</sup>, Mousa Mousavi<sup>2\*</sup> and Ranjith Pathirana<sup>3</sup>

- 1- Ph.D. Student of Pomology, Faculty of Agriculture, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran
- 2- **\*Corresponding Author:** Assistant Professor, Department of Horticultural Science, Faculty of Agriculture, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran (m.mousavi@scu.ac.ir)
- 3- Science Team Leader, The New Zealand Institute for Plant and Food Research, Batchelar Road Palmerston North, New Zealand

Received: 29 June, 2018

Accepted: 21 November, 2018

### **Abstract**

#### **Background and Objectives**

Induced mutations have been used in a wide range of horticultural crops for more than half a century. This approach has opened up great opportunities for biotechnologists and plant breeders to produce new varieties with several new traits including resistance to disease, and tolerance to adverse environmental conditions or even produce new horticultural characters in some crops. The optimization of dosage of the physical and chemical mutagenic agents for inducing mutations is the first step in using this technique in plant breeding. This study was thus conducted to determine the optimum dosage of two mutagenic agents including gamma radiation as a physical agent and ethyl methanesulphonate (EMS) as a chemical agent in kiwifruit callus in vitro conditions. To that end, simple sequence repeat (SSR) markers were used to detect the mutations in the regenerated plantlets.

#### **Materials and Methods**

Having induced the callus in tissue culture media containing naphthaleneacetic acid, 6-benzylamino purine and meta-Topolin, the produced calli were exposed to different dosage of gamma radiation (0, 10, 20, 30, 40, 50 Gy) or different EMS concentrations (0, 0.4, 0.6, 0.8, 1, 1.2 % for 60 min). Then, the calli were transferred to the shoot regeneration media. The number of dead calli, and the size of live calli as well as the number of shoots generated in live calli were then recorded. Afterwards, the regenerated shoots were transferred to elongation media, and the DNA was extracted. The SSR markers analysis was followed on the randomly selected plantlets to detect the SSR markers using a Genetic Analyzer.

#### **Results**

As expected, with increasing the dosage of gamma radiation, the number of dead calli increased and the callus growth was thus retarded. The lowest number of dead calli was, indeed, detected in the control and the 50 Gy dose resulted in the highest number of dead calli. The morphology of shoots generated in the treated calli and the SSR marker analysis showed that 50 Gy dose could be used as the optimum radiation dose to produce an acceptable mutation rate in kiwifruit callus. In turn, EMS as a chemical mutagenic agent showed a different pattern in increasing the number of shoots regenerated with increasing dosage, however the same trend happened with gamma

radiation in the number of dead calli and live callus size. Considering the effect of EMS on callus and the number of shoots regenerated per callus, a treatment with 1% EMS for 60 min can be used to produce a high density mutant population in kiwifruit. The highest mutation rate (12.5 %) was observed in the 50 Gy gamma ray treatment with changes in 12 pairs of SSR markers among 25 loci. For EMS, this value was 2.6 % in 1% concentration treatment.

### **Discussion**

To detect the induced mutations using Gamma ray and EMS, the SSR markers can be applied. However, for the EMS mutation detection, more studies are needed to evaluate the efficiency of other techniques such as single nucleotide polymorphism (SNPs).

**Keywords:** Ethyl methanesulphonate, Gamma radiation, Mutagenesis

## تعیین دز مناسب مواد جهش‌زای فیزیکی و شیمیایی در بافت کالوس برگ کیوی فروت

حسن ساعی آهق<sup>۱</sup>، موسی موسوی<sup>۲\*</sup> و رانجیت پاتیرانا<sup>۳</sup>

۱- دانشجوی دکتری میوه کاری، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

۲- \*نویسنده مسئول: استادیار، گروه باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران (m.mousavi@scu.ac.ir)

۳- سرپرست گروه تحقیقاتی، مرکز تحقیقات گیاه و غذا، مرکز پالمرستون نورث، نیوزلند

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۰۸/۳۰

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۰۴/۰۸

### چکیده

استفاده از مواد جهش‌زای فیزیکی و شیمیایی باعث ایجاد وارته‌های مقاوم به انواع بیماری، مقاوم به شرایط نامطلوب محیطی و حتی سبب بروز خصوصیات جدید در تولیدات کشاورزی در نقاط مختلف جهان شده است. با توجه به اثرات کشنده خیلی از عوامل جهش‌زا در دزهای بالا، تعیین دزهای مناسب با توجه به نوع بافت، شرایط درون سلول و شرایط محیط رشد، گام اولیه در استفاده از این تکنیک‌ها است. استفاده از بافت کالوس به‌عنوان بافت هدف به‌جای جوانه یا بذر روش سریع‌تری جهت تولید گیاهچه‌های جدید جهش‌یافته بدون ظهور بافت شیمیر را ممکن می‌سازد. در پژوهش حاضر با توجه به اهمیت اقتصادی کیوی و نقش ایران در تولید منطقه‌ای این محصول، از بافت کالوس آن به‌عنوان بافت هدف برای تعیین دزهای مناسب از اشعه گاما با شدت تابش صفر، ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰ و ۵۰ گری به‌عنوان جهش‌زای فیزیکی و اتیل‌متان‌سولفونات (EMS) به‌عنوان جهش‌زای شیمیایی با غلظت‌های صفر، ۰/۴، ۰/۶، ۰/۸، ۱ و ۱/۲ درصد در مرکز تحقیقات گیاه و غذا، نیوزلند در سال ۲۰۱۶ انجام شد. شاخص‌های رشد کالوس و همچنین نشانگرهای مولکولی SSR در مرحله گیاهچه، جهت تعیین دزهای مناسب و تغییرات احتمالی ژنتیکی استفاده شد. نتایج نشان داد که با افزایش دز اشعه گاما و غلظت EMS، اندازه کالوس مرده نیز افزایش یافت اما بیشترین تعداد شاخه تولیدشده در تیمار اشعه گاما در دزهای ۴۰ و ۵۰ گری و در تیمار EMS در غلظت ۱ درصد به‌دست آمد. لذا دز ۵۰ گری اشعه گاما و غلظت ۱ درصد EMS به‌عنوان مقادیر مناسب جهت استفاده در بافت کالوس دوماهه کیوی و ایجاد جهش به منظور تولید خصوصیات متفاوت و جدید در جمعیت موتانت تشخیص داده شدند.

کلیدواژه‌ها: اتیل‌متان‌سولفونات، اشعه گاما، عامل جهش‌زا

### مقدمه

مقاومت به بیماری‌ها یا شرایط نامساعد محیطی از دو طریق صورت می‌گیرد: یا از طریق دورگ‌گیری با ارقام مقاوم و یا از طریق روش‌های بیوتکنولوژی مانند انتقال ژن، جهش‌های القایی در سطوح ژنی یا کروموزومی با استفاده از انواع تکنیک‌ها می‌باشد. عمده‌ترین محدودیت روش جنسی ناسازگاری برخی ارقام با یکدیگر و دوره طولانی نونهالی و فرآیند ارزیابی ارقام جدید است (Bourgis *et al.*, 2008). در مقابل، روش‌های کشت

جهش‌ها نقش مهمی در اهلی‌سازی گیاهان ایفا کرده‌اند. جهش طبیعی و انتخاب توسط انسان نیروی لازم برای تکامل در گیاهان را فراهم آورده است (Vilov and Dorofeev, 1992; Fisher, 1999). از طریق اصلاح به روش جهش، مقاوم‌سازی برخی گیاهان نسبت به آفات و بیماری‌ها امکان‌پذیر شده است. در مباحث بیوتکنولوژی کشاورزی اصلاح گیاهان و ایجاد

تئوری هدف مستقیماً بر ماده ژنتیکی اصابت کرده و سبب جهش ژنی یا تغییرات کروموزومی می‌شود. اثر غیرمستقیم این پرتو در سیستم بیولوژیکی تولید رادیکال‌های پراثری می‌باشد که با ایجاد پیوندهای شیمیایی و واکنش با سایر مولکول‌ها انرژی خود را تخلیه می‌کنند. نوترون سریع از راکتورهای اتمی نیز می‌تواند مورد استفاده قرار گیرد که از طریق بخش مشترک FAO/IAEA در وین قابل دسترسی است. بین جهش‌زاهای فیزیکی، اشعه ماوراءبنفش غیر یونیزه کننده، دارای نفوذ کمتر و مؤثر در تولید دیم‌های پورین و پریمیدین و در نتیجه ایجاد جهش نقطه‌ای است. دزهای مورد استفاده و شرایط تابش برای بذور انواع گیاهان مشخص شده ولی اطلاعات جامعی برای محصولات جدید در دسترس نیست. استفاده از این تشعشعات تابع مقدار اکسیژن و رطوبت بافت، سن و شرایط نگهداری قبل از تیمار است (Kodym and Afza, 2003). استفاده از اشعه گاما با مقادیر ۲۰۰، ۴۰۰، ۶۰۰ و ۸۰۰ گری روی بذور فلفل ارقام حساس به بگوموویروس (Begomovirus) برای تولید واریته مقاوم استفاده شده است. از شاخص LD<sub>50</sub> که به مفهوم دز کشنده برای ۵۰ درصد جوانه‌زنی استفاده می‌شود، برای تعیین دز اپتیم استفاده شد. نتایج حاصل از آنالیز تغییرات ژنتیکی، سطوحی از مقاومت را در ارقام نشان داد. در تحقیق دیگری ایجاد مقاومت به فیتوفترا در کنجد با پرتو دهی اشعه گاما روی بذور در کشور سریلانکا انجام شده است. دزهای مورد استفاده بین ۱۰۰ و ۷۵۰ گری بوده که بر روی سه رقم حساس به این بیماری اعمال شدند. پس از مراحل بذرگیری از گیاهان موتانت و تولید لاین‌های جدید، لاین‌های مقاوم به این بیماری با عملکرد بالاتر معرفی شدند (Gaswanto *et al.*, 2016). در تحقیقی دیگر استفاده از اشعه گاما روی جوانه‌های انتهایی ارقام موز دسری (Dessert banana) با دزهای ۱۵، ۳۰، ۴۵ و ۶۰ گری انجام شد، ارقام مختلف مقاومت متفاوتی به اشعه گاما نشان دادند. ارزیابی مقاومت

بافت و بیوتکنولوژی همانند انتقال ژن، استفاده از مواد شیمیایی جهش‌زا و پرتوتابی جهت ایجاد جهش‌های القا، با افزایش کارایی اصلاح و کوتاه کردن زمان دستیابی به ارقام جدید (Purnamaningsih and Hutami, 2016)، فرصت‌های منحصربه‌فردی برای دانش به‌نژادی گیاهان را به‌وجود آورده‌اند. با توجه به محدودیت‌های زیست‌محیطی و اخلاقی در استفاده از روش‌های انتقال ژن و تولید گیاهان تراریخته، استفاده از روش‌های جهش‌زایی اشباعی (Saturation mutagenesis)، گزینه مناسب‌تری به نظر می‌رسد. در جهش‌های معمولی روی بذر یا جوانه مدت زمان تولید موتانت پایدار، طولانی، هزینه‌بر و نیازمند فضای زیاد است. در جهش‌زایی اشباعی در سیستم کشت درون شیشه‌ای با استفاده از تیمار روی بافت کالوس، با توجه به این که جوانه تولیدشده در کالوس منشأ تک‌سلولی دارد با کوتاه کردن دوره‌های بازکشت برای حذف بافت شیمیر تولیدشده در روش‌های معمول جهش در جوانه یا بذر، زمان تولید موتانت جدید پایدار را به‌طور معنی‌داری کاهش می‌دهد (Pathirana *et al.*, 2014). استفاده از کالوس به‌عنوان مواد گیاهی جهت القاء جهش به دلیل وجود توده‌ای از سلول‌های غیرتخصصی و تمایز نیافته از اهمیت زیادی برخوردار است همچنین بدلیل فعال بودن فرآیند تقسیم سلولی در سلول‌های کالوس، حساسیت آن نسبت به مواد جهش‌زا بالا بوده و شانس ایجاد جهش در آن بسیار زیاد است (Purnamaningsih and Hutami, 2016). از طرف دیگر انتخاب موتانت‌های به‌دست آمده نیز زودتر و سریع‌تر می‌باشد (Krupa-Malkiewicz *et al.*, 2017). تشعشعات یونیزه کننده در تحقیقات مربوط به جهش به‌طور گسترده استفاده می‌شوند. پراش اشعه گاما با استفاده از منابع رادیواکتیو نظیر <sup>60</sup>Co و <sup>137</sup>Cs عمومیت یافته و توسط سازمان بین‌المللی انرژی اتمی (IAEA) در اختیار بسیاری از کشورهای در حال توسعه قرار گرفته‌است. پرتو گاما از پرتوهای یونیزه کننده الکترومغناطیسی است، که بنا بر

مرحله خنثی‌سازی است. جهش‌زاهای شیمیایی در القای جهش در کشت درون شیشه‌ای عمومیت دارند با این وجود تشعشعات نیز در دزهای پایین در این موارد استفاده می‌شود (Mohan Jain, 2006).

آزمایش حاضر جهت تعیین دزهای اپتیمم از جهش‌زای فیزیکی اشعه گاما و جهش‌زای شیمیایی EMS روی کالوس کیوی قرمز باهدف تولید سریع جمعیت‌های موتانت انجام شد. بررسی کارکرد نشانگرهای مولکولی SSR برای شناسایی جهش‌های احتمالی ایجادشده و استفاده از آن‌ها برای تعیین دز مناسب ماده جهش‌زا هدف دوم این تحقیق است. مقدار جوانه تولیدشده از هر کالوس و اثر ماده جهش‌زا روی رشد کالوس اندازه‌گیری شد. پس از تولید جمعیت موتانت، استخراج DNA نمونه‌های تصادفی انجام و نشانگرهای مولکولی SSR اختصاصی کیوی جهت شناسایی جهش‌های احتمالی مورد استفاده قرار گرفت.

## مواد و روش‌ها

### مواد گیاهی و محیط کشت

مواد گیاهی از کیوی توسرخ رقم *Actinidia chinensis* 'ZES006' *var. chinensis* معروف به Red9 از کلکسیون درون شیشه‌ای (Debenham *et al.*, 2016) که در چندین چرخه کشت و ازدیاد در محیط MS (Murashige and Skoog, 1962) حاوی ویتامین B<sub>5</sub> (Gamborg *et al.*, 1968) بوده‌اند به‌عنوان ریز نمونه انتخاب شدند.

همه مواد شیمیایی از نمایندگی Sigma Aldrich در نیوزلند تهیه شدند. ظروف پلاستیک استریل برای محیط کشت از شرکت Packing, Auckland Alto Plastic تهیه شدند. برای تمامی محیط‌های کشت pH روی ۵/۸ قبل از قرارگیری در اتوکلاو با دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه تنظیم شد. برای تکثیر، رشد و ریشه‌دهی مواد گیاهی از ظروف پلاستیکی ۲۹۰ میلی‌لیتری با درب پهن فشاری و ۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت استفاده شد.

### تیمار اشعه گاما و EMS

برای تولید کالوس، قطعات برگ‌گی حاصل از جوانه‌های رشدیافته در کشت بافت بر روی محیط کشت القاء

به دزهای اشعه گاما از طریق اندازه‌گیری وزن تر تولیدشده انجام شد. این مقاومت وابسته به سطح پلوئیدی و نوع هیبرید ارقام بود. تفاوت‌های فنوتیپی چشمگیری بعد از ایجاد جهش در کلون‌های حاصل مشاهده شد. بعد از ارزیابی در محیط گلخانه، رقمی با گلدهی سریع‌تر مشخص شد. آنالیز الکتروفورسیس پروتئین، تغییر ژنتیکی موجود در رقم جدید در مقایسه با رقم مادری را نشان داد (Novak *et al.*, 1990). در برزیل برای ایجاد جهش در موز از دز ۲۰ گری اشعه گاما در جوانه‌های کشت‌بافتی استفاده شد. ارزیابی خصوصیات آگرونومی جمعیت‌های تولیدشده در سطح مزرعه، تولید ارقام جدید پاکوتاه با خصوصیات مفید را تأیید کرده‌است. با استفاده از نشانگرهای مولکولی SSR تغییرات ژنتیکی بین جمعیت‌های موتانت ارزیابی شد و با آنالیز داده‌های حاصل، فاصله ژنتیکی بین موتانت‌ها بین ۰/۲۶ و ۰/۶۴ و با میانگین ۰/۴۵۹ برآورد شد. با بررسی مقادیر حاصله و بررسی تغییرات سوماکلونی می‌توان بیان داشت که فاصله حاصل ناشی از تابش اشعه گاما بوده که می‌تواند در برنامه‌های اصلاحی موز از اشعه گاما استفاده شود (Pestanana *et al.*, 2011). نشانگرهای مولکولی SSR نشانگرهای همباز هستند که کاربرد زیادی در روش‌های مختلف اصلاح نباتات دارند (Kiani, 2017; Karami and Imanikhah, 2012).

بی‌نظمی در توزیع کروموزوم‌ها در اثر تشعشعات یونیزه‌کننده سبب شده تا محققین به فکر یافتن راهکاری برای این موضوع باشند. بنابراین استفاده از جهش‌زاهای شیمیایی رایج شد. جهش‌زاهای شیمیایی علاوه بر سهولت استفاده، دارای قیمت مناسب نیز هستند (Khalil *et al.*, 2018). استفاده از دامنه گسترده مواد شیمیایی، تعیین قوانین و مقررات برای استفاده از این مواد را مشکل کرده‌است. عمومی‌ترین مواد شیمیایی جهش‌زا، عوامل آلکیل‌کننده نظیر اتیل‌متان‌سولفونات (EMS) با فرمول شیمیایی  $\text{CH}_3\text{SO}_3\text{C}_2\text{H}_5$  است که این امر به‌خاطر کاربری آسان و سمیت‌زدایی آسان از طریق هیدرولیز در

۰/۸، ۱ و ۱/۲ درصد تیمار شدند. تیمار به مدت یک ساعت روی شیکر با سرعت ۱۰۰ دور در دقیقه انجام شد. پس از تیمار کالوس‌ها با محیط کشت مایع MS حاوی ۳ درصد ساکارز دو بار شستشو داده شدند و روی محیط کشت باززایی شاخساره تا زمان تولید جوانه‌ها با اندازه استاندارد به مدت ۷۰ روز قرار داده شدند. پس از تیمار، محیط حاوی EMS با استفاده از محلول هیدروکسید سدیم جهت جلوگیری از اثرات زیست‌محیطی طبق کاتالوگ محصول خنثی شد.

پس از تولید جوانه و رشد آن‌ها در اندازه مناسب تمامی آن‌ها از قسمت‌های مختلف کالوس به‌جز جوانه‌های جانبی به محیط رشد جوانه کیوی منتقل شدند. پس از ۴۵ روز گیاهچه‌های تولیدشده در اندازه بین ۳ تا ۵ سانتی‌متر به محیط ریشه‌زایی منتقل شدند. ریشه‌زایی گیاهچه‌ها پس از تهیه نمونه پشتیبان، با فروری در محلول ۰/۱ اکسین و سپس کشت در محیط کشت عاری از تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی انجام شد. برای اندازه‌گیری مساحت سطح مقطع کالوس‌های از بین رفته در اثر تیمار از نرم‌افزار ایمج جی (ImageJ) استفاده شد.

قابل ذکر است که تیمار دز ۳۰ گری اشعه گاما دچار آلودگی در مرحله انتقال به محیط کشت شدند و از آزمایش حذف شدند که با توجه به نتایج تأثیری در نتیجه تحقیق نداشته است.

کالوس (Callus induction) با مشخصات جدول (۱) (Mathew *et al.*, 2018) کشت شدند.

تیمار تابش اشعه رادیواکتیو گاما در مرکز تحقیقات سرطان دانشگاه اکلند کشور نیوزلند با استفاده از دستگاه الودرادو-۷۸ با یون کبالت انجام شد. دزهای انتخاب‌شده شامل صفر، ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰ و ۵۰ گری بودند. برای تعیین زمان موردنیاز تابش جهت دستیابی به این دزها از رابطه (۱) و با توجه به دفترچه راهنمای دستگاه استفاده شد.

$$\text{Time (m)} = \frac{\text{Dose}}{K} \quad (1)$$

شاخص K بر اساس زمان‌بندی دستگاه تابش‌دهنده برحسب زمان جاگذاری منبع اشعه گاما، میزان نیمه عمر آن در دستگاه و فاصله نمونه‌ها از منبع تابش تعیین می‌شود که در این پژوهش عدد ۲/۴۳ و در زمان موردنیاز برای تأمین دز مطلوب به ترتیب ۴/۱۱، ۸/۲۳، ۱۲/۳۴، ۱۶/۴۶ و ۲۰/۵۷ دقیقه محاسبه شد. سپس کالوس‌ها جهت تحریک تولید جوانه به محیط کشت باززایی شاخساره (Shoot regeneration) جدول (۱) (Mathew *et al.*, 2018) منتقل و کشت شدند.

برای تیمار اتیل‌متان‌سولفونات (EMS) کالوس‌های حاصل پس از دو ماه در محیط کشت مایع با همین ترکیبات بدون آگار حاوی EMS با مقادیر ۰/۴، ۰/۶،

جدول ۱- مشخصات محیط‌های کشت مورد استفاده برای القاء کالوس‌زایی و باززایی شاخساره از نمونه برگی کیوی فروت

Table 1. Callus induction and shoot regeneration medias from leaf explant of kiwifruit

نام ترکیب Component name	غلظت در محیط Concentration in medium	
	القاء کالوس Callus induction	باززایی شاخساره Shoot regeneration
	MS Macro (20X)	25 ml
MS Micro (200X)	5 ml	5 ml
Fe-Na EDTA (200X)	5 ml	5 ml
B5 Vitamins (200X)	5 ml	5 ml
NAA	0.1 mg	0.1 mg
BAP	3 mg	1 mg
ZEA	-	3 mg
Meta Topoline	1 mg	-
Sucrose	30 g	30 g
Phytigel	2.5 g	2.5 g

GeneMarker® v 2.2.0 آنالیز شد. درصد تغییرات شناسایی شده از طریق رابطه (۲) به دست آمد.

رابطه (۲)

$$\text{درصد تغییرات} = \frac{\text{تعداد بانداضافه شده یا باند حذف شده}}{\text{تعداد مکان ژنی تحت پوشش} \times \text{تعداد نمونه}} \times 100$$

نتایج دستگاه Genetic Analyzer حضور یا عدم حضور باندها را در نهایت به صورت ۱ و صفر نشان می‌دهد که پس از مقایسه با نمونه کنترل می‌توان تعداد باندهای حذف شده یا اضافه شده را محاسبه کرد.

### نتایج و بحث

تجزیه واریانس اثر تیمار اشعه گاما و EMS روی رشد کالوس و تولید جوانه، اثر معنی‌دار هر دو تیمار در سطح یک درصد را نشان می‌دهد (جدول ۳). جدول ۳ مقادیر F در هر دو تیمار در متغیرهای اندازه کالوس و میانگین تعداد جوانه در کالوس‌های زنده متأثر از تیمارهای ذکر شده را به صورت کلی نشان می‌دهد. برای تعیین میزان مطلوب اشعه گاما، دزهای متفاوت اشعه گاما در تیمارها بررسی شدند (شکل ۱).

### استفاده از نشانگرهای SSR جهت تعیین تغییرات ژنتیکی حاصل از جهش در جمعیت

جهت استخراج DNA ژنومی، نمونه برگ از نه گیاهچه تولیدشده از هریک از تیمارهای EMS و اشعه گاما استفاده شد. نمونه‌ها به صورت سه تایی برای تهیه یک نمونه بالک باهم مخلوط شدند (در سه تکرار) و تا زمان استخراج DNA در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. استخراج DNA با استفاده از CTAB (Doyle, 1987) انجام شد. از دوازده جفت آغازگر اختصاصی کیوی معرفی شده توسط Heather Basset و Fraser *et al.* (2009) (انتشار نیافته، طراحی شده از ژنوم اسمبل شده کیوی Red9 ورژن PS1.1.68.5) برای شناسایی جهش‌های احتمالی در هر دو گروه از جمعیت موتانت حاصل از اشعه گاما و اتیل‌متان‌سولفونات استفاده شد. PCR با استفاده از نسخه تغییر یافته سیستم آغازگر فلورسانت M13 (Schuelke, 2000) و برنامه Touchdown PCR با دمای اتصال ۶۰-۵۵ درجه سانتی‌گراد طبق اطلاعات جدول (۲) انجام شد. قطعات حاصل از PCR با استفاده از دستگاه (Applied Biosystems Inc, Foster City, CA, USA 3500 Genetic Analyzer) جداسازی و اندازه آن‌ها با نرم‌افزار

جدول ۲- ترتیب دما و زمان استفاده شده برای Touchdown PCR در نشانگرهای SSR کیوی

Table 2. Temperature and time order for Touchdown PCR in kiwifruit SSR markers

توضیحات	مدت زمان (ثانیه)	دما (سانتی‌گراد)
Description	Time (S)	Temperature (°C)
	120	94
10 cycles, -0.5 per Cycle	55	60
	60	72
-	90	72
	55	94
30 Cycles	55	55
	90	72

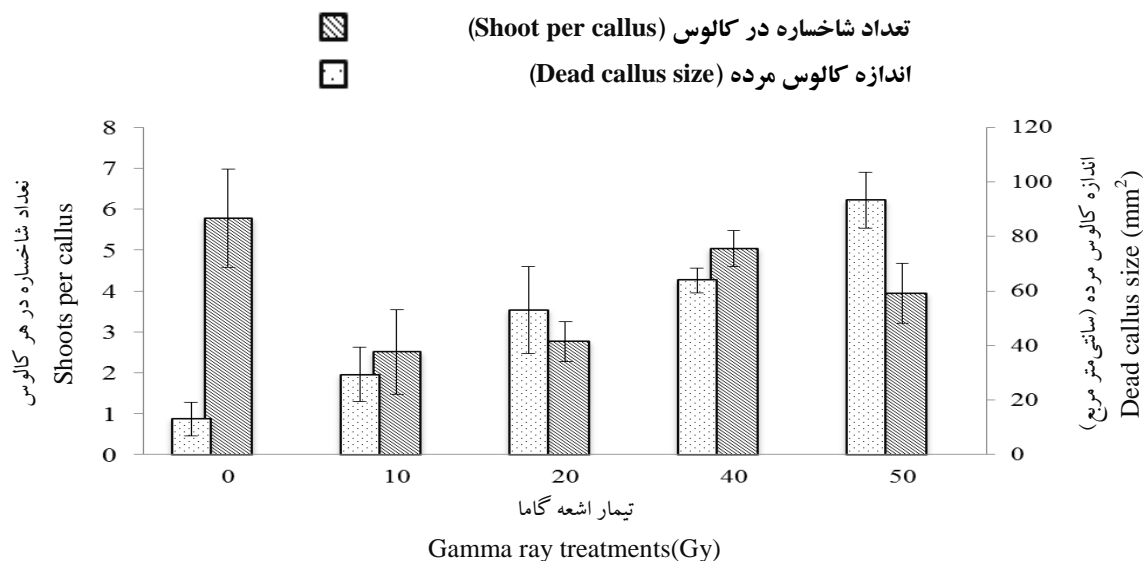
جدول ۳- تجزیه واریانس اثر تیمارها بر متغیرهای اندازه‌گیری شده

Table 3. Variance analysis of effects of growth factors on the measured variables

مقادیر F برای اتیل‌متان‌سولفونات	مقادیر F اشعه گاما	عامل رشدی
F Value EMS	F Value Gamma Radiation	Growth factor
52.87**	40.78**	اندازه کالوس مرده
		Dead callus size
23.06**	10.77**	میانگین تعداد شاخساره
		Average shoot number

\*\* معنی‌داری در  $p < 0.01$  را نشان می‌دهد.

\*\* Shows significant difference in  $p < 0.01$ .



شکل ۱- اثر اشعه گاما روی تعداد شاخساره تولیدشده و اندازه کالوس‌های مرده کیوی فروت

شاخص خطای استاندارد (SE) نشان داده شده است

Figure 1. Effect of gamma radiation on shoot number production and dead callus size in kiwifruit Standard Error (SE) has been shown

تصادفی از جمعیت‌های تولیدشده پس از عامل جهش‌زای رادیواکتیو اشعه گاما و EMS، وجود تغییرات ژنتیکی در موتانت‌های تولیدشده را نشان داد (شکل ۴).

در دزهای اشعه گاما بیشترین تعداد تغییرات شناسایی شده توسط ۱۲ جفت نشانگر SSR روی ۲۴ مکان ژنی مختلف در دز ۵۰ گری اشعه گاما با مقدار ۱۲/۵ درصد به دست آمد. مقایسه بین مقدار جوانه تولیدشده از هر کالوس و درصد بالای جهش در دز ۵۰ گری اشعه گاما نشان می‌دهد که این دز نسبت به دزهای دیگر مؤثرتر بوده و شانس بالاتری جهت تولید گیاهچه موتانت برای خصوصیت مورد نظر را دارد. تجزیه نشانگرهای SSR برای جمعیت موتانت‌های تولیدشده از ماده جهش‌زای EMS مقادیر خیلی پایین جهش را به ۲/۶ درصد و ۱/۳ درصد در غلظت‌های ۰/۴ و ۱/۲ درصد EMS به دست آمد. این مقادیر پایین صرفاً نمی‌توانند مقدار جهش‌های ایجادشده در مکان‌های ژنی مورد مطالعه را نشان دهند. این امر می‌تواند به دلیل ماهیت نقطه‌ای جهش در تیمار EMS است (Sega, 1984). این امر نشان می‌دهد نشانگرهای SSR گزینه مناسبی برای مطالعات تعیین جهش‌های نقطه‌ای نمی‌باشند. با این حال بر اساس مکانیسم

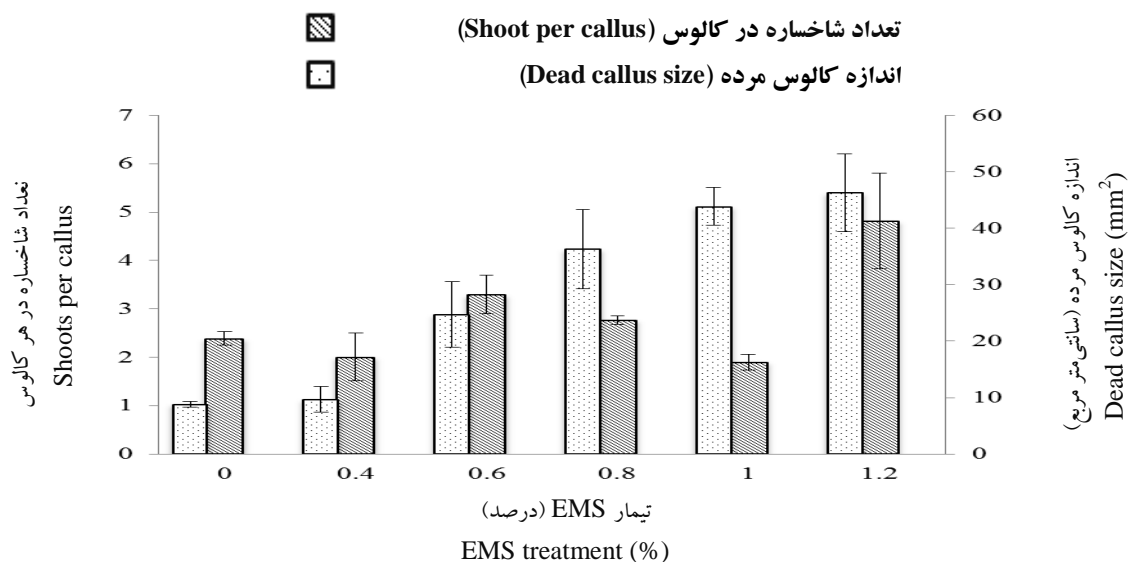
بر اساس نتایج حاصل، تیمار شاهد داری کمترین اندازه از کالوس‌های مرده و تیمار ۵۰ گری دارای بزرگ‌ترین اندازه کالوس مرده با مساحت ۶/۳ میلی‌متر مربع که نشان‌دهنده تنش حاصل از تیمار است. تیمار ۴۰ گری دارای بیشترین تعداد شاخساره تولیدشده در هر کالوس (۵/۲) بود. اثر ماده جهش‌زای EMS روی کالوس در غلظت‌های ۰/۴، ۰/۶، ۰/۸، ۱ و ۱/۲ نشان داد که با افزایش غلظت ماده جهش‌زا اندازه کالوس‌هایی که در اثر این ماده قادر به رشد نبوده و از بین رفتند افزایش یافت. (2017) Krupa-Malkiewicz *et al.* نیز نتایج مشابهی برای هیبرید *Petunia × atkinsiana* به دست آوردند. اثر ماده EMS روی مقدار جوانه تولیدشده از کالوس متفاوت بود به طوری که در غلظت ۰/۶ و ۱/۲ درصد به طور معنی‌داری بیشتر از کالوس‌های نمونه شاهد بود. کمترین مقدار جوانه تولیدشده از کالوس در غلظت یک درصد EMS مشاهده شد (شکل ۲). یکی از عوامل مؤثر در میزان جهش القاء شده، ظرفیت سلول در بازسازی ژنوم خود می‌باشد (Hussain *et al.*, 2018).

علاوه بر تغییرات فنوتیپی (شکل ۳) در بعضی از گیاهچه‌ها، نتایج تجزیه نشانگرهای SSR روی نمونه‌های



عمل نشانگرهای SSR و جهش‌های نقطه‌ای، می‌توان بیان کرد که با افزایش غلظت EMS، صدمات ناشی از جهش‌های تصادفی در سلول به‌طور کلی سبب مرگ سلول شده و جوانه‌های تولیدشده در واقع با منشأ لایه‌های زیرین کالوس بوده که کمترین تأثیر را از ماده جهش‌زا گرفته‌اند. در حقیقت با در نظر گرفتن مفهوم شاخص  $LD_{50}$  و منشأ سلولی جوانه‌ها به‌نظر می‌رسد غلظت یک درصد EMS غلظتی مناسب برای کالوس کیوی جهت تولید جمعیت قابل قبول با بالاترین احتمال جهش مطلوب است.

عمل نشانگرهای SSR و جهش‌های نقطه‌ای، می‌توان بیان کرد که جهش موجود در روی محل اتصال آغازگر روی DNA است که سبب عدم کارکرد آغازگر و غیبت قطعه مورد انتظار در فرآیند خوانش توسط دستگاه آنالایزر است. از جهت تعیین دز مناسب در مطالعات تعیین دزهای اپتیمم از شاخص  $LD_{50}$  جهت نشان دادن اثر تیمار روی رشد جوانه تحت اثر تیمار ماده جهش‌زا استفاده می‌شود (Gaswanto *et al.*, 2016). به خاطر ماهیت کالوس و با توجه به این‌که هر جوانه منشأ تک سلولی دارد



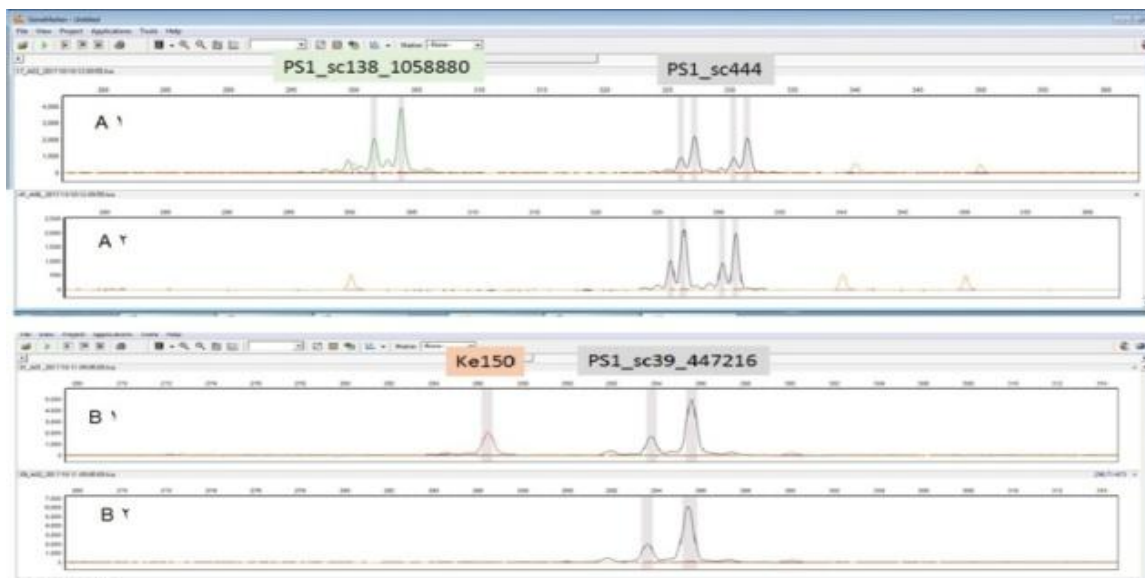
شکل ۲- اثر تیمار اتیل‌متان‌سولفونات (EMS) روی تعداد شاخساره تولیدشده و اندازه کالوس‌های مرده کیوی فروت شاخص خطای استاندارد (SE) نشان داده شده است

Figure 2. Effect of Ethyl Methane Sulphonate (EMS) on shoot number production and dead callus size in kiwifruit Standard Error (SE) has been shown



شکل ۳- تغییرات فنوتیپی قابل مشاهده در اثر تیمارهای جهش‌زای اشعه گاما و EMS

Figure 3. Visible phenotypic changes after gamma ray and EMS mutagenesis treatments



شکل ۴- نمونه جهش به وجود آمده در اثر تابش اشعه گاما در نمونه موتانت کیوی نشان داده شده با نشانگر SSR ناپدید شدن دو باند در اندازه ۳۰۲ و ۳۰۴ bp در نشانگر PS1-sc138-1058880 در نمونه موتانت (A<sub>2</sub>) در مقایسه با کنترل (A<sub>1</sub>). همچنین ناپدید شدن قطعه ۲۸۶ bp از نشانگر Ke150 در نمونه موتانت (B<sub>2</sub>) در مقایسه با نمونه کنترل (B<sub>1</sub>)

**Figure 4. Some examples of induced mutation after gamma ray irradiation on kiwifruit detected using by SSR markers**

Two disappeared band with 302 and 304 bp length in the PS1-SC138-1058880 marker in the mutant plantlet (A<sub>2</sub>) comparison with the control (A<sub>1</sub>). Disappeared band with 286 bp length in the Ke150 marker mutant plantlet (B<sub>2</sub>) comparison with the control (B<sub>1</sub>)

پرایمرها جهت آنالیز SSR کمال تشکر را داریم. همچنین از آندرو مولان و بلیندا دینهم برای تأمین مواد کشت بافت تشکر می‌کنیم. تأمین مالی این کار توسط مرکز تحقیقات گیاه و غذا، نیوزلند انجام شده است

### تضاد منافع

بدین وسیله نویسندگان تصریح می‌نمایند که هیچ گونه تعارض منافی در خصوص پژوهش حاضر وجود ندارد.

### سهم نویسندگان

دکتر موسی موسوی و دکتر رانجیت پاتیرانا به عنوان اساتید راهنما و نویسندگان، حسن ساعی آهق به عنوان انجام‌دهنده تحقیق و کمک در نگارش این مقاله بوده‌اند.

### نتیجه‌گیری

برای تولید جمعیت موتانت با هدف ایجاد بالاترین احتمال جهش مطلوب، استفاده از دز ۵۰ گری اشعه گاما به عنوان جهش‌زای فیزیکی و غلظت یک درصد EMS به عنوان دزهای مطلوب روی کالوس کیوی قرمز می‌تواند مورد استفاده قرار گیرد. برای شناسایی تغییرات ژنتیکی حاصل از جهش‌زای فیزیکی اشعه گاما، استفاده از نشانگرهای SSR نتایج رضایت بخشی ارائه می‌دهد ولی استفاده از این نشانگرها برای شناسایی جهش‌هایی با منشأ تک نوکلئوتیدی روش مناسبی نیست.

### سپاسگزاری

از هدر باست و کلودیا ویدو برای فراهم نمودن

## References

- Bourgis, F., Guyot, R., Gherbi, H., Tailliez, E., Amabile, I., Salse, J. and Ghesquiere, A. (2008). Characterization of the major fragrance gene from an aromatic japonica rice and analysis of its diversity in Asian cultivated rice. *Theoretical and Applied Genetics*, 117(3), 353-368.

- Debenham, M. C., Seelye, J. F. and Mullan, A. C. (2016). An in vitro repository for clonal kiwifruit. *Acta Horticulturae*, 1113, 93-98.
- Doyle, J. J. (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem Bulletin Botanical Society of America*, 19, 11-15.
- Fisher, R. A. (1999). *The genetical theory of natural selection: A complete variorum edition*. Oxford, UK: Oxford University Press.
- Fraser, L. G., Tsang, G. K., Datson, P. M., De Silva, H.N., Harvey, C. F., Gill, G. P. and McNeilage, M. A. (2009). A gene-rich linkage map in the dioecious species *Actinidia chinensis* (kiwifruit) reveals putative X/Y sex-determining chromosomes. *BMC Genomics*, 10(102), 1-15.
- Gamborg, O.L., Miller, R. and Ojima, K. (1968). Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Research*, 50(1), 151-158.
- Gaswanto, R., Syukur, M., Purwoko, B. S. and Hidayat, S. H. (2016). Induced mutation by gamma rays irradiation to increase chilli resistance to Begomovirus. *Agrivita*, 38(1), 24-32.
- Hussain, M., Iqba, M. A., Till, B. J. and Rahman, M. (2018). Identification of induced mutations in hexaploid wheat genome using exome capture assay. *Plos One* 13(8), e0201918.
- Karami, S. and Imanikhah, F. (2012). Crop species transposability of sorghum microsatellite markers in sugarcane and maize. *Plant Productions*, 34(2), 27-38. [In Farsi]
- Khalil, F., Naiyan, X., Tayyab, M. and Pinghua, C. (2018). Screening of EMS-induced drought-tolerant sugarcane mutants employing physiological, molecular and enzymatic approaches. *Agronomy*, 8(10), 1-13.
- Kiani, G. (2017). Identification of restoring fertility and maintainer rice varieties using SSR marker. *Plant Productions*, 40(1), 81-86. [In Farsi]
- Kodym, A. and Afza, R. (2003). Physical and chemical mutagenesis. *Plant Functional Genomics*, 236, 189-203.
- Krupa-Malkiewicz, M., Kosatka, A. Smolik, B. and Sedzik, M. (2017). Induced mutations through EMS treatment and in vitro screening for salt tolerance plant of *Petunia × atkinsiana* D. Don. *Not Bot Horti Agrobi*, 45(1), 190-196.
- Mathew, L., McLachlan A., Jibrán R., Burrit D. J. and Pathirana R. (2018). Cold, antioxidant and osmotic pre-treatments maintain the structural integrity of meristematic cells and improve plant regeneration in cryopreserved kiwifruit shoot tips. *Protoplasma*, 255(4), 1065-1077.
- Mohan Jain, S. (2006). Mutation-assisted breeding for improving ornamental plants. *Acta horticulturae*, 714(714), 85-98.
- Murashige, T. and Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(3), 473-497.
- Novak, F. J., Afza, R., Duren, M. V. and Omar, M. S. (1990). Mutation induction by gamma irradiation of in vitro cultured shoot-tips of banana and plantain (*Musa cvs*). *Tropical Agriculture*, 67(1), 21-28.
- Pathirana, R., Deroles, S., Hoata, K., Montefiori, M., Tyson, J., Wang, T. and Hellens, R. P. (2014). Fast-tracking kiwifruit breeding through mutagenesis. *Acta Horticulturae*, 1127, 217-222.
- Pestanana, R. K. N., Amorim, E. P., Ferreira, C. F., de Oliveira Amorim, V. B., Oliveira, L. S., da Silva Ledo, C. A. and Silva, S. D. O. (2011). Agronomic and molecular characterization of gamma ray induced banana (*Musa sp.*) mutants using a multivariate statistical algorithm. *Euphytica*, 178(2), 151-158.

- Purnamaningsih, R. and Hutami, S. (2016). Increasing Al-Tolerance of sugarcane using ethyl methane sulphonate and in vitro selection in the low pH media. *Hayati Journal of Biosciences*, 23(1), 1-6.
- Schuelke, M. (2000). An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. *Nature Biotechnology*, 18(2), 233-234.
- Sega, G. A. (1984). A review of the genetic effects of ethyl methanesulfonate. *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology*, 134(2-3), 113-142.
- Vavilov, N. I. and Dorofeev, V. F. (1992). *Origin and geography of cultivated plants*. Cambridge, UK: Cambridge University Press.



© 2019 by the authors. Licensee SCU, Ahvaz, Iran. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution-Non Commercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0 license) (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>)