Cereal Biotechnology and Biochemistry

Online ISSN: 2783-5170

Homepage: https://cbb.razi.ac.ir

Mutation breeding in rice using gamma irradiation and mature and immature embryo culture

Davood Kazemi [1] ✉ & Masoud Rahimi [1]

[1] Nuclear Agricultural Research Institute, Karaj, Iran.

✉ Corresponding author. E-mail: davood_kazemi_g@yahoo.com

ABSTRACT

Introduction: The use of seeds to create genetic mutation brings problems because the use of seeds increases the duration of the research, and the study of traits requires plant cultivation, making it impossible to test more than once a year. Another point is the presence of shimmer in mutant plants. Biotechnology techniques, especially tissue culture, solve these problems today. In this method, a repeatable and efficient regeneration system is needed to create mutations in rice plants to obtain fertile plants from the changed tissues.

Materials and methods: To determine the appropriate dose of mutation induction to create genetic changes in the callus tissue obtained from the mature and immature embryos of Nemat and Taram rice varieties, a factorial experiment was carried out within a completely randomized design using doses of 20, 30, 40, 50 and 60 Gy (GY) of Gamma radiation in four replications. For callus generation, MS medium with 0.5 mg/liter 2, 4-D and 1 mg/liter Kasein was suitable for both cultivars. Also, for the regeneration of calluses obtained from both types of embryos of the Tarom cultivar, MS base medium containing 4 mg/liter of BAP, 0.5 mg/liter of IAA, 0.5 mg/liter of NAA, and 5 mg/liter of Kasien were used. In the final stage, 30-day-old calluses were subjected to gamma radiation treatment with five doses of 20, 30, 40, 50 and 60 Gy. They were compared with the control treatment in the regeneration stage regarding moisture percentage, growth rate and regeneration percentage.

Results: After irradiation, the effect of variety on regeneration percentage, growth rate based on weight and callus diameter, the effect of embryo type on regeneration percentage and moisture percentage, the effect of radiation on all studied traits, the effect of variety × embryo only for regeneration percentage and moisture percentage, the effect of variety × radiation for all traits and the effect of embryo × radiation and cultivar × embryo × radiation were significant only for the percentage of reproduction. The LD50 obtained in Nemat and Tarom cultivars with mature embryos was related to doses of 26.78 and 41.83 Gray, respectively; with immature embryos, it was 14.55 and 35.30 Gray, respectively.

Conclusion: The difference in this experiment can not only be caused by genetic differences, but it can also be due to the difference in callus humidity and the effect of gamma rays.

Keywords: rice, mutation, embryo culture, gamma irradiation.

Article Type: Research Article

Article history: Received: 18 Jan 2023, **Revised:** 12 Feb 2023, **Accepted:** 22 Feb 2023, **Published online:** 28 Mar 2023

Cite this article: Kazemi, D. & Rahimi, M. (2023). Mutation breeding in rice using gamma irradiation and mature and immature embryo culture. Cereal Biotechnology and Biochemistry, 2 (1), 22-41. DOI: 10.22126/cbb.2023.9030.1043

© The Author(s).

Publisher: Razi University

10.22126/cbb.2023.9030.1043

بیوتکنولوژی و بیوشیمی غلات
شاپا الکترونیکی: ۵۱۷۰-۲۷۸۳
Homepage: https://cbb.razi.ac.ir

اصلاح از طریق جهش در برنج با استفاده از اشعه گاما و کشت جنین بالغ و نابالغ

داود کاظمی [۱]✉ و مسعود رحیمی [۱]

[۱] پژوهشکده تحقیقات کشاورزی هسته‌ای، کرج، ایران.
✉نویسنده مسئول. رایانامه: davood_kazemi_g@yahoo.com

چکیده

مقدمه: از معایب استفاده از بذر جهت ایجاد جهش ژنتیکی می‌توان به افزایش مدت زمان تحقیق، لزوم کشت کشت گیاه جهت اندازه گیری صفات وو وجود شیمر در گیاهان موتانت اشاره نمود. برای حل این مشکلات امروزه از فنون بیوتکنولوژی مخصوصاً کشت بافت استفاده می‌شود. در این روش برای ایجاد جهش در گیاه برنج نیاز به سیستم باززایی تکرار پذیر و کارا است تا بتوان از بافت‌های تغییر یافته، گیاهان بارور به دست آورد.

مواد و روش‌ها: جهت تعیین دز مناسب القاء جهش برای ایجاد تغییرات ژنتیکی در بافت کالوس حاصل از جنین بالغ و نابالغ واریته‌های نعمت و طارم محلی، آزمایشی به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با استفاده از دزهای ۲۰ ، ۳۰، ۴۰، ۵۰ و ۶۰ گری (GY) پرتو گاما به همراه شاهد در چهار تکرار اجرا گردید. جهت کالوس‌زایی، محیط کشت MS با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر توفوردی و ۱ میلی‌گرم در لیتر کازئین، برای هر دو رقم مناسب تشخیص داده شد. همچنین برای باززایی کالوس‌های حاصل از هر دو نوع جنین رقم طارم، محیط پایه MS حاوی ۴ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IAA و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۵ میلی‌گرم در لیتر کازئین و برای رقم نعمت در هر دو نوع ماده گیاهی محیط کشت MS تکمیل شده با ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP، ۲ میلی‌گرم در لیتر KIN و ۱ میلی‌گرم در لیتر IAA استفاده شد. در مرحله نهایی کالوس‌های ۳۰ روزه پرتودهی شده به همراه تیمار شاهد در مرحله باززایی با یکدیگر از نظر صفاتی همچون درصد رطوبت، سرعت رشد و درصد باززایی مقایسه شدند.

یافته‌ها: پس از پرتوتابی، اثر رقم بر درصد باززایی، سرعت رشد بر اساس وزن و سرعت رشد قطر کالوس و اثر نوع جنین بر درصد باززایی و درصد رطوبت، اثر پرتو برای تمام صفات مورد بررسی، اثر متقابل رقم×جنین نیز فقط برای درصد باززایی و درصد رطوبت، اثر متقابل رقم×پرتو برای تمام صفات و اثر متقابل جنین×پرتو و رقم×جنین×پرتو فقط برای درصد باززایی معنی دار شد. متوسط دز کشنده (LD_{50}) بدست آمده در رقم نعمت و طارم با جنین بالغ به ترتیب مربوط به دزهای ۲۶/۷۸ و ۴۱/۸۳ گری و با جنین نابالغ به ترتیب ۱۴/۵۵ و ۳۵/۳۰ گری بود.

نتیجه‌گیری: اختلاف حاصل در این آزمایش نه تنها می‌تواند ناشی از تفاوت های ژنتیکی باشد بلکه می تواند به دلیل تفاوت در میزان رطوبت کالوس و تأثیر پرتو گاما باشد.

واژه‌های کلیدی: برنج، جهش، کشت جنین، پرتو گاما.

نوع مقاله: مقاله پژوهشی

نوع مقاله: دریافت: ۱۴۰۱/۱۰/۲۸ **اصلاح:** ۱۴۰۱/۱۱/۲۳ **پذیرش:** ۱۴۰۱/۱۲/۰۳، **انتشار آنلاین:** ۱۴۰۲/۰۱/۰۸

استناد: کاظمی، د. و رحیمی، م. (۱۴۰۲). اصلاح از طریق جهش در برنج با استفاده از اشعه گاما و کشت جنین بالغ و نابالغ. بیوتکنولوژی و بیوشیمی غلات. ۲ (۱)، ۲۲-۴۱. DOI: 10.22126/cbb.2023.9030.1043

ناشر: دانشگاه رازی

© نویسندگان.

مقدمه

مهم‌ترین عامل افزایش تولید برنج در سال‌های اخیر، افزایش تولید در واحد سطح می‌باشد و این عمل با استفاده از روش‌های نوین به‌نژادی سرعت بیشتری گرفته است. به دلیل این که کشور ما یکی از مصرف‌کننده‌های بزرگ برنج است، این نیاز به طور جدی احساس می‌شود که محققین کشور هرچه سریع‌تر از این روش‌ها برای اصلاح ارقام داخلی استفاده نمایند. البته لازم است در شروع برنامه‌های تحقیقاتی هر کدام از این روش‌ها را برای هر رقم خاص بهینه نمود. لازمه شروع هر برنامه اصلاحی وجود تنوع ژنتیکی است که امروزه محققین با کمبود این تنوع مواجه می‌باشند. یکی از روش‌هایی که می‌تواند در حل این مشکل به به‌نژادگران یاری رساند، استفاده از القاء جهش می‌باشد. جهش یا جهش به‌عنوان تغییر ناگهانی در مواد ژنتیکی تعریف شده است که بخشی از پدیده‌های اساسی مربوط به حیات را تشکیل می‌دهد. به‌طور کلی به تغییرات ارثی ناگهانی در موجود زنده، جهش گویند. جهش ممکن است خودبخودی و یا القایی باشد. جهش خودبخودی ممکن است ناشی از خطاهای متابولیسمی باشد که به آن خودبخودی واقعی گویند و یا ناشی از عوامل ناشناخته محیطی مثلاً اشعه ماوراء بنفش و سایر عوامل طبیعی باشد (Snustad & Simmons, 2015). از آن‌جا که فراوانی جهش‌های طبیعی در شرایط معمول به شدت پایین است، القای جهش مصنوعی و اصلاح از طریق آن، روشی سودمند در افزایش تنوع در گیاهان است (Arulbalachandran *et al.*, 2010). جهشی که با به‌کار بردن مواد شیمیایی در موجودات ایجاد می‌شود، جهش القایی نامیده می‌شود. هر دو نوع جهش خودبخودی و القایی در اغلب موارد برای موجود حامل آن‌ها، زیان‌بار هستند. با این وجود، از آنجا که تغییرات ناشی از جهش تصادفی است، گاهی اوقات و هر چند نادر، جهشی اتفاق می‌افتد که به نفع موجود بوده و موجب افزایش توانایی بقاء، رشد و تولیدمثل می‌گردد. نوترکیبی بین مواد ژنتیکی جدید حاصل از جهش و مواد ژنتیکی موجود، طیف وسیعی از مواد متنوع ژنتیکی را به‌وجود می‌آورد که از بین آن‌ها، ژنوتیپ‌هایی که سازگاری بهتری با محیط دارند باقی مانده و تکثیر می‌یابند و آن‌هایی که از سازگاری ضعیفی برخوردارند، از بین خواهند رفت. بر این اساس، اصلاح‌کنندگان گیاهی به القای جهش به‌منظور دستیابی به تنوع ژنتیکی مورد نظر مبادرت می‌ورزند (Farsi & Bagheri, 2004). اصلاح از طریق جهش یک فناوری کارآمد در دستان به‌نژادگران است که به شکستن ترکیبات آللی نامطلوب کمک و تغییرات ژنتیکی مطلوبی ایجاد می‌کند. طبق اطلاعات پایگاه داده تنوع ناشی از جهش فائو تا کنون بیش از ۸۲۰ رقم جهش یافته برنج از طریق اصلاح جهش در سراسر جهان ایجاد شده‌اند (MVD, 2018).

در به‌نژادی، در نظر گرفتن فاکتورهای اقتصادی و مدت زمان اجرای پروژه ضروری است. معمولاً زمانی از اصلاح به روش جهش استفاده می‌شود که صفت در ژرم‌پلاسم گیاه

موجود نباشد و یا امکان انتقال آن میسر نگردد و یا ممکن است برای اهلی کردن گونه‌های وحشی بکار گرفته شود (Asencion, 1977; Basri, 2005; Lapade *et al.*, 2002; Micke *et al.*, 1991; Rashed *et al.*, 2000).

اتم‌های رادیواکتیو در واقع اتم‌های ناپایدار دارای انرژی یا جرم اضافه می‌باشند که برای رسیدن به حالت پایدار، انرژی جرم اضافه را به صورت چهار پرتو یون‌ساز اولیه شامل آلفا، بتا، گاما و نوترون آزاد می‌سازند. پرتوهای گاما نتیجه بازگشت هسته به حالت پایدار خود می‌باشند. پرتوهای ایکس نیز از جنس پرتوهای گاما بوده و هر وقت که یک الکترون مداری در یک اتم به حالت پایدارتر خود انتقال می‌یابد ایجاد می‌گردند. پرتوهای ایکس و گاما از پرتوهای الکترومگنتیت بوده و در پرتوتابی بذور یا بافت رویشی گیاه کاربرد زیادی دارند. پرتو گاما نسبت به پرتو ایکس، دارای طول موج کوتاه‌تر با انرژی بیشتر در واحد پروتون می‌باشد. چشمه‌های تولید پرتو گاما اغلب در گلخانه‌ها[1]، اطاقک‌های مصنوعی کشت[2] و مزارع[3] مورد استفاده قرار می‌گیرند (Stadler, 1930; Novak, 1991; Bronzema *et al.*, 1996). زمانی‌که عامل موتاژن بر توده‌ای از سلول مانند بذر، سلول‌های بافت مریستمی و سایر اندام‌های گیاه اثر می‌گذارد هر سلول می‌تواند جهش یابد. نتاج سلول‌های موتانت و همچنین سلول‌های غیرموتانت مجاور دارای ژنوتیپ های متفاوت خواهند بود (Omiya & Ken, 2004; Sukekiyo & Kimura, 1991).

اولین گام در این مسیر، انتخاب والدین مناسب می‌باشد. بدین معنی که والدین می‌بایست سازگار، پرعملکرد و دارای تعداد معدودی عیب باشند. البته می‌توان برای ایجاد تنوع در صفات کمی و کیفی، والدین را تصادفی انتخاب کرد. برای اینکه حداکثر گیاهان موتانت در نسل دوم به دست آید، دز مناسب باید حداکثر گیاهان بارور در نسل اول را تولید کند. با کاربرد تکنیک اصلاح از طریق جهش می‌توان گیاهانی با توانایی بالا در مناطق اقلیمی نامناسب که دارای نقاط ضعفی مانند ترشح مواد سمی و سایر مواد مضر، ریزش دانه و یا دوره طولانی غیر فعال بذر می‌باشند را اصلاح نمود. در سال‌های اخیر، علاقه به تجدید حیات جهش به چشم می‌خورد و آن به دلیل مزایای زیاد استفاده از آن به‌صورت ادغام شده با تکنیک کشت بافت باشد. دلایل عمده‌ای که باعث استفاده از روش کشت بافت در اصلاح از طریق جهش شده است، عبارتند از امکان بررسی جمعیت‌های بیشتر در زمان کمتر و اطمینان به خلوص موتانت‌ها در مقایسه با آزمایشات گلخانه‌ای و مزرعه‌ای (Basri, 2005; Gasol *et al.*, 2001; Soeranto *et al.*, 2002; Zhen, 2001). روش‌های مختلف بیوتکنولوژی مانند ریزازدیادی یا تولید دابل‌هاپلوئیدی می‌توانند گام‌هایی سریع، ساده‌تر و ارزان‌تر در رسیدن به اهداف اصلاحی باشند (Anonymous, 1995; Micke *et al.*, 1991).

---

1. Gamma greenhouse
2. Gamma room
3. Gamma field

تولید کالوس در گیاهان تک‌لپه‌ای معمولاً مشکل‌تر از گیاهان دولپه‌ای صورت می‌گیرد. به همین دلیل، برای القا و تشکیل کالوس، نیاز به اضافه کردن هورمون‌های مصنوعی می‌باشد (Yan *et al*., 2010). میزان موفقیت در رشد کالوس و باززایی گیاه در غلات بستگی زیادی به نوع ریزنمونه جدا شده دارد. به طور کلی، قسمت‌های رویشی گیاهان نسبت به قسمت‌های زایشی، آمادگی بیشتری برای باززایی دارند و قابلیت ژنتیکی باززایی در این خصوص در تمام ارقام وجود دارد (Gholami & Tarinejad, 2018). اگرچه جنین نابالغ یکی از مناسب‌ترین ریز نمونه‌ها در کشت بافت این غلات می‌باشد، اما به عنوان ریزنمونه دارای برخی از معایب نیز می‌باشد؛ از جمله اینکه در دسترس بودن آن‌ها محدود به دوره کوتاهی از زمان رشد در سال می‌باشد و نیز جداسازی سخت و مشخص کردن مرحله کشت مناسب آن مشکل می‌باشد (Hagio *et al*., 2002). اما به دلیل سهولت استفاده از جنین رسیده، پژوهشگران ترجیح می‌دهند از این نوع جنین برای مطالعه خود به جای جنین نارس استفاده نمایند (Gholami & Tarinejad, 2018). جنین‌های بالغ به دلیل در دسترس بودن در هر فصل از سال، جداسازی آسان و حداقل تغییر پذیری و وضعیت فیزیولوژیکی آن به عنوان یک جایگزین موثر برای جنین‌های نابالغ می‌باشد (Yu *et al*., 2019).

اصلاح از طریق جهش، یک رویکرد مهم در زمینه به نژادی است که به‌خصوص در برنج باعث توسعه و رها سازی تعداد زیادی ارقام اصلاح شده گردیده است (Da Luz *et el*., 2020). بنابراین هدف از انجام آزمایش حاضر، تعیین دز مناسب القاء جهش برای ایجاد تغییرات ژنتیکی در بافت کالوس حاصل از جنین بالغ و نابالغ در دو رقم برنج نعمت (رقم اصلاح شده) و طارم محلی (رقم بومی) بود.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

بذور دو رقم مورد استفاده در این تحقیق (طارم محلی و نعمت) از مؤسسه تحقیقات برنج آمل تهیه گردید. برای تهیه جنین بالغ از بذر استفاده شد اما برای تهیه جنین نابالغ، از پانیکول‌های حاصل از کشت هیدروپونیک استفاده شد. در کشت جنین بالغ، پس از گذشت ۲۴ ساعت از پخش محیط کشت در داخل پتری‌ها و آماده کردن بذور ضد عفونی، لامینار و وسایل مورد نیاز برای کشت، ابتدا بذور ضدعفونی شده چندین مرتبه توسط آب مقطر اتوکلاو شده شستشو داده شدند و سپس جنین‌ها توسط پنس و تیغ جراحی از آندوسپرم بذر جدا شده و تعداد ۱۰ عدد از آن‌ها داخل هر پتری کشت گردید. قسمت برش خورده جنین به سمت بالا و نوک جنین در محیط کشت قرار داده شد. برای کشت جنین نابالغ ابتدا پانیکول‌های که قبلاً زمان شروع گرده‌افشانی آن‌ها مشخص شده بود و مدت ۱۵ روز از گرده‌افشانی آن‌ها می‌گذشت، انتخاب گردید و برای کشت به آزمایشگاه انتقال داده شد. در آزمایشگاه بذوری که

آندوسپرم آن‌ها به صورت شیری بود از پانیکول جدا و با همان روش ضدعفونی بذور بالغ، ضدعفونی شدند. با توجه به نتایج بهینه‌سازی اولیه شرایط محیط کشت، برای رقم نعمت از محیط کشت کالوس‌زایی حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر توفوردی و ۱ میلی‌گرم در لیتر کازئین و برای رقم طارم، محیط کشت حاوی ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر توفوردی همراه با ۱ میلی‌گرم در لیتر کازئین در هر دو نوع کشت جنین بالغ و نابالغ استفاده شد.

محیط کشت باززایی

محیط کشت باززایی پرتودهی شده برای رقم نعمت در هر دو نوع ماده گیاهی، محیط کشت موراشیگ و اسکوگ[4] (MS) تکمیل شده با دو میلی‌گرم در لیتر بنزیل آمینو پورین (BAP)، دو میلی‌گرم در لیتر کینتین (KIN) و یک میلی‌گرم در لیتر ایندول استیک اسید (IAA) بود. در رقم طارم محلی نیز در هر دو نوع ماده گیاهی از محیط کشت پایه MS تکمیل شده با چهار میلی‌گرم در لیتر BAP، ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IAA، ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر نفتالین اسید استیک (NAA) و پنج میلی‌گرم در لیتر کازئین هیدرولیزات استفاده شد. در مرحله باززایی پس از انتقال کالوس‌ها به داخل شیشه‌های حاوی محیط کشت، کالوس‌ها به مدت ۲۴ ساعت در اطاقک رشد در دمای ۳۸ درجه سانتی‌گراد و فتوپریود ۱۶ ساعت نور و ۸ ساعت تاریکی قرار داده شدند. پس از ۲۴ ساعت درجه حرارت به ۱±۳۰ درجه سانتی‌گراد رسانده شد.

پرتودهی

کالوس‌های مناسب بر اساس روش‌های تعیین شده، قبل از انتقال به محیط کشت باززایی به آزمایشگاه گاماسل انتقال داده شد و با دزهای۲۰، ۳۰، ۴۰، ۵۰ و ۶۰ گری (GY) در معرض تابش پرتو گاما قرار گرفتند. کالوس‌های پرتوتابی شده در آزمایشگاه کشت بافت به محیط کشت باززایی منتقل شده و در اتاقک رشد به همراه تیمار شاهد (کالوس پرتودهی نشده) در شرایط باززایی قرار گرفتند. صفات اندازه‌گیری شده در مراحل مختلف شامل درصد کالوس‌زایی، سرعت رشد کالوس، درصد رطوبت کالوس و درصد باززایی بود.

برای انجام مرحله دزیابی پرتو گاما کالوس‌های ایجاد شده قبل از انتقال به محیط کشت باززایی، مورد تیمار پرتو گاما قرار گرفتند و سپس هریک از ارقام به محیط کشت باززایی مربوط به خود منتقل شدند. پس از پرتودهی کالوس‌ها و انتقال آن‌ها به محیط کشت باززایی، درصد رطوبت، سرعت رشد بر اساس وزن کالوس، سرعت رشد بر اساس قطر کالوس و درصد باززایی اندازه‌گیری شد.

تجزیه داده‌ها

آزمایش به صورت فاکتوریل سه عاملی (رقم، پرتو و جنین) در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار تکرار انجام گردید. تجزیه

[4] Murashige and Skoog

داده ها با ا ستفاده از نرم‌افزار های آ ماری MSTAT-C و SAS انجام شد. از تبدیل زاویه‌ای برای داده های در صدی غیر نرمال و از تبدیل جذری برای داده‌های عددی غیر نرمال ا ستفاده شد. مقایسه م یانگین به روش دانکن در سطح احتمال پنج درصد صورت گرفت.

نتایج و بحث

درصد باززایی پس از پرتودهی

نتایج تجزیه واریانس صفات کالوس‌زایی و باززایی پس از پرتودهی آن در جدول ۱ ارائه شده است. پس از پرتوتابی، اثر رقم بر درصد باززایی، سرعت رشد بر اساس وزن و سرعت رشد قطر کالوس و اثر نوع جنین بر درصد باززایی و درصد رطوبت معنی‌دار شد. اثر پرتو برای تمام صفات مورد بررسی معنی‌دار بود. اثر متقابل رقم×جنین نیز فقط برای درصد باززایی و درصد رطوبت معنی‌دار شد. اثر متقابل رقم×پرتو برای تمام صفات معنی‌دار شد. اثر متقابل جنین×پرتو و رقم×جنین×پرتو فقط برای درصد باززایی معنی‌دار شدند (جدول ۱).

جدول ۱- تجزیه واریانس صفات کالوس‌زایی و باززایی پس از پرتودهی.

Table 1. Analysis of variance for callus formation and regeneration traits after irradiation.

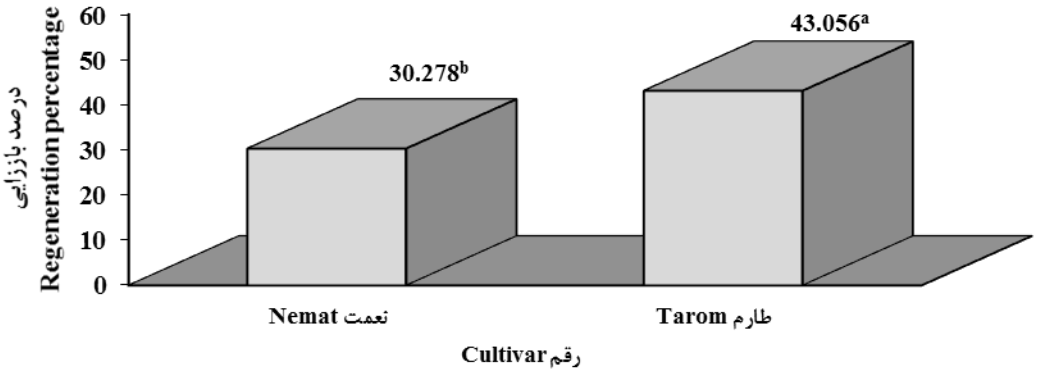
منابع تغییرات S.O.V	درجه آزادی df	میانگین مربعات (Mean squres)			
		درصد باززایی Regeneration percentage	درصد رطوبت Moisture pescentage	سرعت رشد بر اساس وزن کالوس Growth rate based on callus weight	سرعت رشد بر اساس قطر Growth rate based on callus diameter
رقم Cultivar (C)	1	5877.77**	151.32 ns	0.00071528**	0.00306983**
جنین Emberyo (E)	1	2500.00**	16.48**	0.00018802ns	0.00072212ns
پرتو Irradiation (I)	5	18186.66**	1119.87**	0.00029993**	0.01851023**
رقم ×جنین C×E	1	4444.44**	6.27**	0.00005855ns	0.00000000ns
رقم × پرتو C×I	5	637.77*	456.16**	0.00042145**	0.00169427**
جنین ×پرتو E×I	5	940.00**	116.97 ns	0.00010416ns	0.00039699ns
رقم×جنین×پرتو C×E×I	5	524.44**	168.01 ns	0.00014362ns	0.00041995ns
اشتباه Error	72	227.77	107.06	0.00008189	0.00023519
ضریب تغییرات (٪) CV%	-	16.41	13.15	23.33	76.54

* و **: به ترتیب معنی‌دار در سطوح احتمال ۵٪ و ۱٪؛ ns: غیر معنی‌دار

* and **: significant at 5% and 1% probability level, respectively; ns: not significant

درصد باززایی

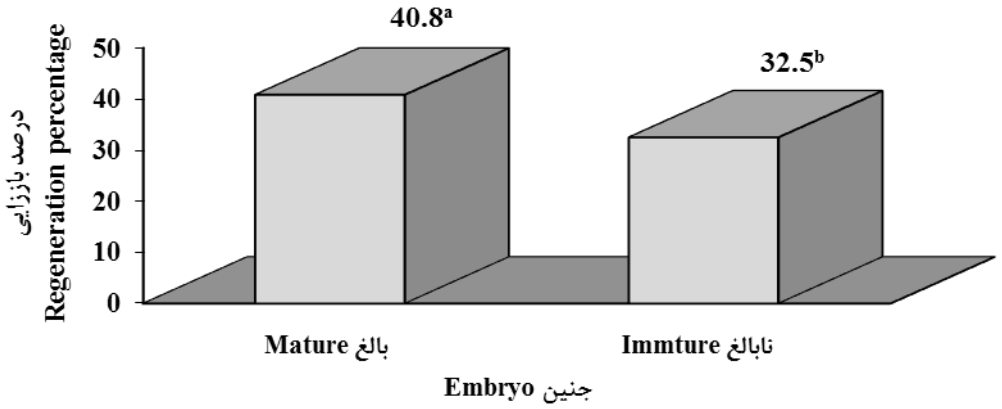
نتایج نشان داد که درصد باززایی رقم طارم به‌طور معنی‌داری از رقم نعمت بیشتر بود (شکل ۱). این نتایج با واکنش اثر دو رقم مورد مطالعه بر باززایی بدون پرتودهی در همین مطالعه مشابه نبود که می‌توان این گونه نتیجه گرفت که به دلیل بالاتر بودن درصد رطوبت در کالوس‌های رقم نعمت نسبت به رقم طارم، اثر پرتو بر کاهش باززایی آن‌ها بیشتر بوده و به همین دلیل باززایی این رقم پس از پرتودهی کاهش بیشتری نشان داد.



شکل ۱- مقایسه میانگین دو رقم برنج نعمت و طارم از نظر درصد باززایی پس از پرتودهی.

Figure 1. comparison of the mean of Nemat and Tarom rice cultivars in terms of percentage of regeneration after irradiation.

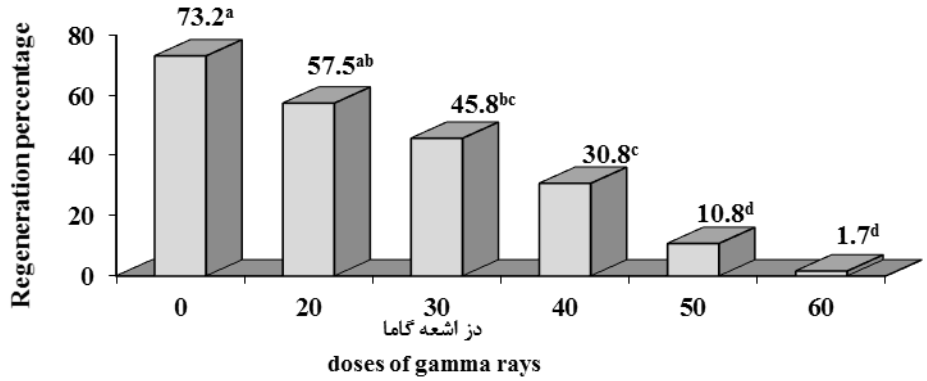
مقایسه میانگین‌های جنین بالغ و نابالغ نشان داد که در صد باززایی جنین بالغ به‌طور معنی‌داری از جنین نابالغ پس از پرتودهی بیشتر بود (شکل ۲). این نتایج با واکنش اثر نوع جنین بر باززایی در شرایط بدون پرتودهی در همین مطالعه مشابه نبود.



شکل ۲- نتایج حاصل از مقایسه جنین بالغ و نابالغ از نظر درصد باززایی پس از پرتودهی.

Figure 2. The comparison of mature and immature embryos in terms of percentage of regeneration after irradiation.

نتایج مقایسه میانگین دزهای مختلف اشعه گاما بر درصد باززایی در شکل ۳ ارائه شده است. مقایسه میانگین‌های پنج دز اشعه گاما نشان داد که اختلاف معنی‌داری بین سطوح ۰ (شاهد) و ۲۰ گری وجود ندارد. همچنین بین دزهای ۲۰ و ۳۰ گری نیز تفاوت معنی‌داری دیده نشد. بین سطوح ۳۰ و ۴۰ گری نیز تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد. سطوح ۵۰ و ۶۰ گری تفاوت معنی‌داری با دیگر سطوح نشان دادند. درصد باززایی با افزایش دز اشعه گاما کاهش یافت (شکل ۳). همان طور که در شکل ۳ مشخص شده است، میزان باززایی در دز های ۵۰ و ۶۰ گری بسیار اندک بود.



شکل ۳- مقایسه دزهای مختلف اشعه گاما برای درصد باززایی.

Figure 3. Comparison of different doses of gamma rays for regeneration percentage.

نتایج به دست آمده نشان داد که بیشترین درصد باززایی آمد (جدول ۲).

توسط رقم نعمت با جنین نابالغ پس از پرتودهی به دست

جدول ۲- مقایسه میانگین اثر متقابل رقم و نوع جنین برای درصد باززایی در هفته دوم پس از پرتوتابی.

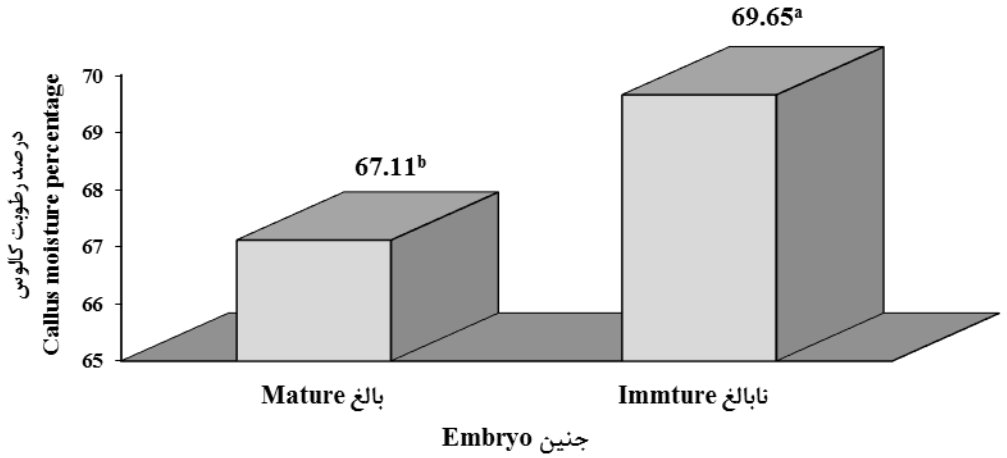
Table 2. Comparison of the mean for interaction effect of cultivar and embryo type for the percentage of regeneration in the second week after irradiation.

درصد باززایی Regeneration percentage	جنین Embryo	رقم Cultivar
40[a]	بالغ mature	نعمت Nemat
25[b]	نابالغ immature	نعمت Nemat
41[a]	بالغ mature	طارم Tarom
44[a]	نابالغ immature	طارم Tarom

Means with the same letters have no significant difference (P≥05.0)

درصد رطوبت کالوس

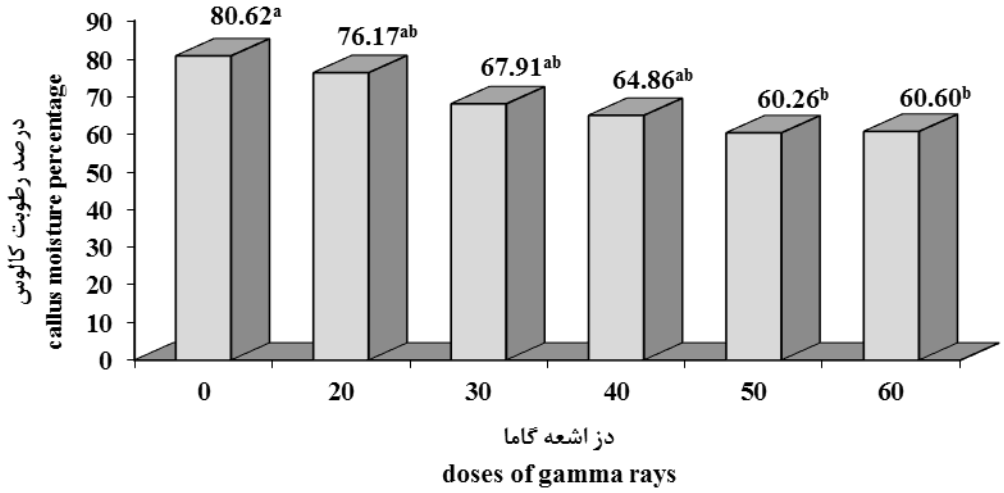
مقایسه میانگین جنین بالغ و نابالغ نشان داد که در صد رطوبت کالوس جنین بالغ به‌طور معنی‌داری از جنین نابالغ کمتر بود (شکل ۴).



شکل ۴- مقایسه جنین بالغ و نابالغ از نظر درصد رطوبت کالوس پس از پرتودهی.

Figure 4. Comparison of mature and immature embryos in terms of callus moisture percentage after irradiation.

مقایسه میانگین دزهای مختلف اشعه گاما نشان داد که اختلاف معنی‌داری بین سطوح ۰ ، ۲۰، ۳۰ و ۴۰ گری با سطوح ۵۰ و ۶۰ گری موجود بود. افزایش دز اشعه گاما، باعث کاهش درصد رطوبت کالوس‌ها گردید (شکل ۵).

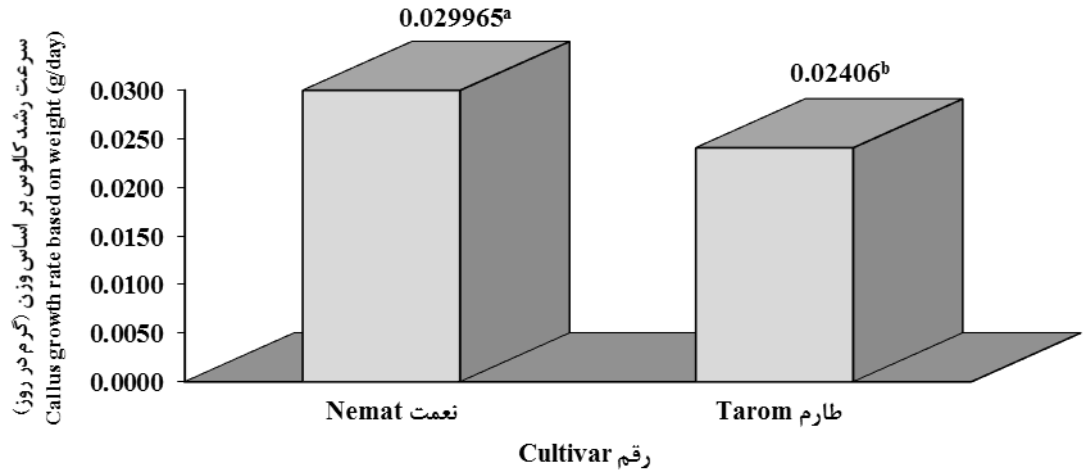


شکل ۵- مقایسه دزهای مختلف اشعه گاما از نظر درصد رطوبت کالوس.

Figure 5. Comparison of different doses of gamma rays in terms of callus moisture percentage.

سرعت رشد بر اساس وزن کالوس

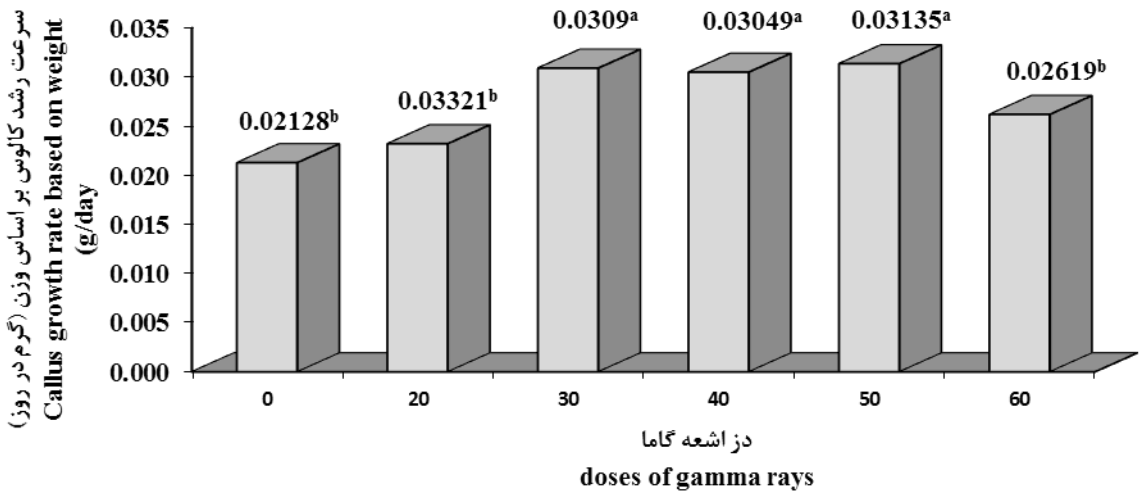
مقایسه میانگین دو رقم برنج نعمت و طارم نشان داد که سرعت رشد رقم نعمت به طور معنی‌داری از رقم طارم بیشتر بود (شکل ۶).



شکل ۶- مقایسه دو رقم برنج نعمت و طارم از نظر سرعت رشد بر اساس وزن کالوس پس از پرتودهی.

Figure 6. Comparison of Nemat and Tarom rice varieties in terms of growth speed based on callus weight after irradiation.

مقایسه میانگین پنج دز اشعه گاما نشان داد که سرعت رشد با افزایش دز پرتو تا سطح ۵۰ گری افزایش می‌یابد ولی افزایش دز پرتو تا سطح ۶۰ گری باعث کاهش سرعت رشد گردید. دلیل آن می‌تواند به خاطر تأثیر پرتو در اوایل انتقال و یکسان نبودن اثر پرتو در اعماق مختلف بافت باشد (شکل ۷).

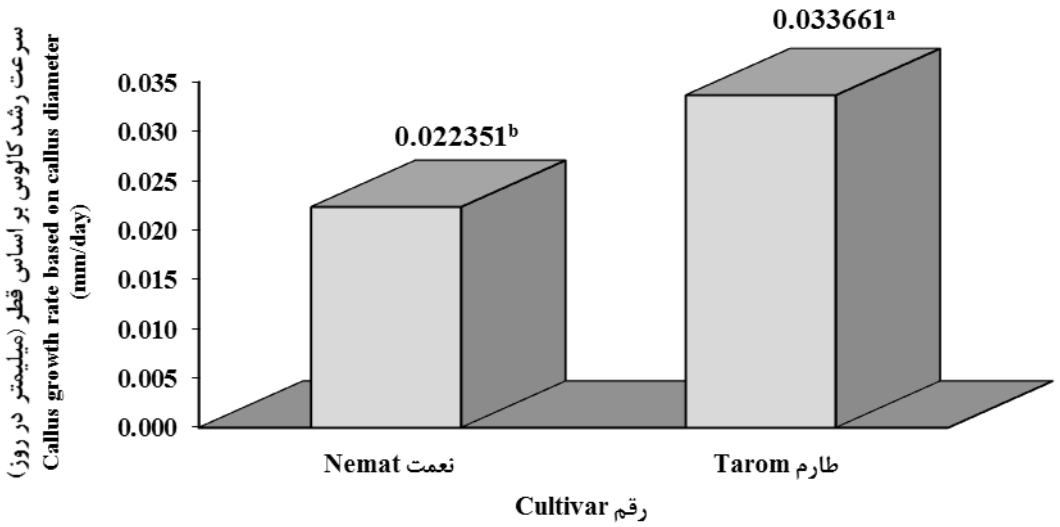


شکل ۷- مقایسه دزهای مختلف اشعه گاما از نظر سرعت رشد بر اساس وزن کالوس.

Figure 7. Comparison of different doses of gamma rays in terms of growth rate based on callus weight.

سرعت رشد بر اساس قطر کالوس

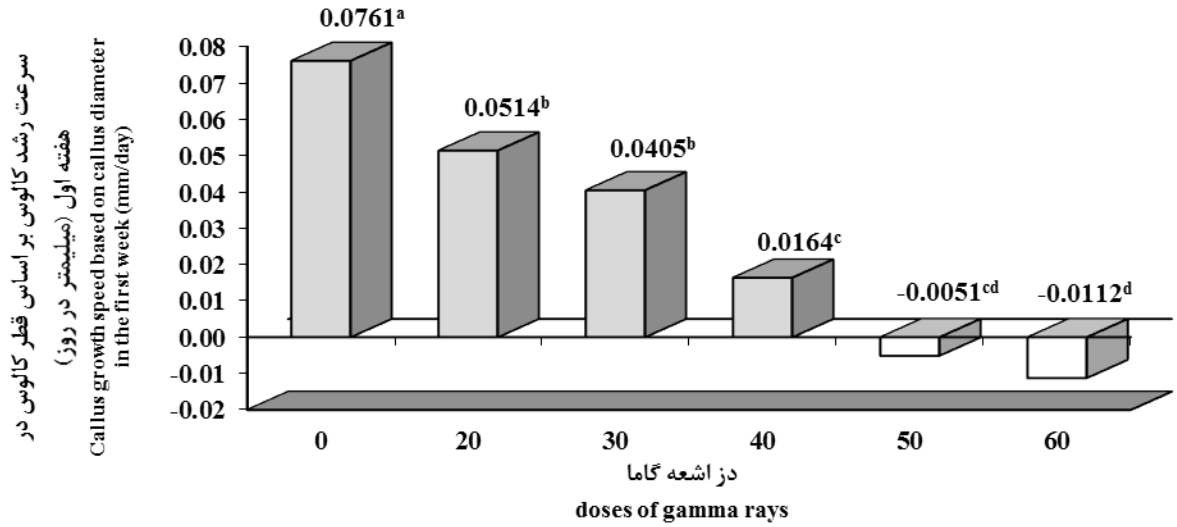
مقایسه میانگین‌های دو رقم برنج نعمت و طارم از نظر سرعت رشد براساس قطر کالوس نشان داد که تفاوت معنی‌داری بین ارقام مورد مطالعه در سطح احتمال ۱٪ وجود داشت و رقم طارم رشد سریع‌تری از رقم نعمت پس از پرتودهی داشت (شکل ۸).



شکل ۸- مقایسه دو رقم برنج نعمت و طارم از نظر سرعت رشد بر اساس قطر کالوس.

Figure 8. Comparison of Nemat and Tarom rice varieties in terms of growth rate based on callus diameter.

مقایسه میانگین دزهای مختلف اشعه گاما نشان داد که افزایش دز اشعه گاما، باعث کاهش سرعت رشد گردید (شکل ۹).



شکل ۹- مقایسه دزهای مختلف اشعه گاما از نظر سرعت رشد بر اساس قطر کالوس پس از پرتوتابی.

Figure 9. Comparison of different doses of gamma rays in terms of growth rate based on callus diameter after irradiation.

نتایج مقایسه میانگین اثرات متقابل رقم و میزان اشعه گاما برای صفات مختلف مورد مطالعه در جدول ۳ ارائه شده است. در هر دو رقم با افزایش دز پرتو، درصد باززایی و رطوبت (به جز دز ۶۰ گری رقم طارم) کاهش یافت. سرعت رشد بر اساس وزن در رقم نعمت با افزایش دز پرتو افزایش پیدا کرد ولی در رقم طارم این افزایش تا دز ۳۰ گری صورت گرفته و از آن به بعد تا دز ۶۰ گری کاهش یافت.

جدول ۳- مقایسه میانگین اثرمتقابل رقم و پرتو برای صفات مختلف باززایی.

Table 3. Comparison of the mean interaction effect of variety and radiation for different reproductive traits.

سرعت رشد براساس قطر (میلیمتر/روز) Growth rate based on diameter (mm/day)	سرعت رشد بر اساس وزن (گرم/روز) Growth rate based on weight (gram/day)	درصد رطوبت Moisture percentage	درصد باززایی Regeneration percentage	پرتو Irradiation	رقم Cultivar
0.05628^{bc}	0.02362^{abc}	79^{ab}	73.33^{a}	0	Nemat
0.03556^{cd}	0.02750^{abc}	73.1^{ab}	53.33^{bc}	20	
0.03505^{cd}	0.02760^{abc}	69.5^{abc}	36.67^{cd}	30	
0.0143^{def}	0.02931^{abc}	68.2^{abc}	18.33^{e}	40	
0.0003^{efg}	0.03403^{a}	63.0^{bcd}	0.0000^{g}	50	
-0.0074^{fg}	0.03773^{a}	49.70^{d}	0.0000^{g}	60	
0.09593^{a}	0.01893^{bc}	82.12^{a}	73.33^{a}	0	Tarom
0.06723^{b}	0.01892^{bc}	79.15^{ab}	61.67^{ab}	20	
0.04587^{bc}	0.03420^{a}	66.29^{abc}	55.0^{abc}	30	
0.01848^{de}	0.03167^{ab}	61.45^{cd}	43.33^{bc}	40	
-0.01047^{g}	0.02866^{abc}	57.43^{cd}	21.67^{de}	50	
-0.01508^{g}	0.01466^{c}	75.1^{abc}	3.333^{fg}	60	

در هر ستون، میانگین‌هایی که دارای حروف مشابه هستند، اختلاف معنی‌داری با هم ندارند (P≥05.0)

In each Columns, means with the same letters have no significant difference (P≥05.0)

جدول ۴- مقایسه میانگین اثرمتقابل جنین و پرتو برای صفات مختلف باززایی.

Table 4. Comparison of the average effect of embryo and radiation for different reproductive traits.

سرعت رشد براساس قطر (میلی‌متر/روز) (Growth rate based on diameter (mm/day)	درصدرطوبت Moisture percentage	درصد باززایی Regeneration percentage	پرتو Irradiation	جنین Embryo
0.08410^{a}	83.05^{a}	88.33^{a}	0	Mature
0.05666^{bc}	80.35^{a}	63.33^{b}	20	
0.04602^{bc}	67.08^{ab}	51.67^{bc}	30	
0.01259^{def}	61.48^{b}	31.67^{d}	40	
-0.00831^{fg}	59.25^{b}	8.33^{f}	50	
-0.00657^{fg}	61.68^{b}	1.67^{f}	60	
0.06811^{ab}	78.20^{a}	58.33^{bc}	0	Immature
0.04613^{bc}	71.99^{ab}	51.67^{bc}	20	
0.03490^{cd}	68.74^{ab}	40.00^{cd}	30	
0.02019^{de}	68.24^{ab}	30.00^{de}	40	
-0.00190^{efg}	61.22^{b}	13.33^{ef}	50	
-0.01589^{g}	59.52^{b}	1.67^{f}	60	

در هر ستون، میانگین‌هایی که دارای حروف مشابه هستند، اختلاف معنی‌داری با هم ندارند (P≥05.0)

In each Columns, means with the same letters have no significant difference (P≥05.0)

نتایج مقایسه میانگین اثرمتقابل نوع جنین و میزان اشعه برای صفات مختلف باززایی در جدول ۴ ارائه شده است. در هر دو نوع جنین با افزایش دز پرتو، درصد باززایی و رطوبت (به جز دز ۶۰ گری رقم نعمت) کاهش یافت. سرعت رشد بر اساس قطر در دو نوع جنین با افزایش دز پرتو کاهش پیدا کرد.

صفاتی همچون درصد باززایی گیاه، رطوبت کالوس، سرعت رشد (بر اساس اختلاف وزن کالوس در دو نمونه‌گیری که اولی در زمان انتقال کالوس‌های پرتو دیده به محیط باززایی و دومی ۲۰ روز پس از پرتودهی صورت گرفت) اندازه‌گیری شد. همچنین سرعت رشد کالوس بر اساس اختلاف قطر کالوس در دو نمونه‌گیری، در فاصله زمانی هفت روز پس ازکشت و ۱۵ روز پس از آن محاسبه گردید و نتایج در جدول ۵ نشان داده شده است. درصد باززایی در رقم طارم بیشتر از رقم نعمت بود. می‌توان احتمال داد به دلیل بالا بودن رطوبت کالوس رقم نعمت، پرتو گاما بیشتر بر رقم طارم تأثیرگذار بود. درصد باززایی جنین بالغ بیشتر از جنین نابالغ بود. با افزایش میزان پرتو، میزان باززایی و درصد رطوبت کالوس کاهش یافت. از نظر قطر کالوس، رقم طارم سرعت بیشتری از رقم نعمت نشان داد. با افزایش پرتو، سرعت رشد کالوس نیز کاهش یافت. نتایج به دست آمده نشان داد که رطوبت می‌تواند روی مقدار تأثیر پرتو گاما تأثیرگذار باشد، زیرا بر اساس نتایج به دست آمده درصد رطوبت کالوس‌های رقم نعمت بیشتر از رقم طارم بود و این باعث شد که رقم نعمت سریع‌تر از رقم طارم در اثر پرتودهی، باززایی خود را از دست بدهد.

بررسی همبستگی صفات بررسی شده در مرحله دزیابی

به منظور بررسی روابط موجود بین صفات اندازه‌گیری شده، ضرایب همبستگی بین این صفات تعیین گردید (جدول ۶). در هر دو رقم و برای هر دو نوع جنین، همبستگی مثبت و معنی‌داری بین درصد باززایی و درصد رطوبت کالوس در مرحله باززایی مشاهده شد و رابطه مثبت و معنی‌دار بین درصد رطوبت با سرعت رشد بر اساس وزن کالوس وجود داشت. این نشان می‌دهد به دلیل زنده بودن کالوس‌های باززا شده درصد رطوبت آن‌ها نیز بالاتر از کالوس هایی بوده که باززا نشده و در اثر پرتو نکروزه گردیده‌اند.

سرعت رشد بر اساس وزن رابطه معکوس و معنی‌داری با سرعت رشد بر اساس قطر داشت. همان طور که در جدول ۶ نمایان است رابطه معنی‌داری ما بین سرعت رشد بر اساس قطر کالوس با درصد باززایی و درصد رطوبت وجود نداشت که می‌تواند به خاطر اثر پرتو در تمام سطوح دز پرتو در روزهای اول انتقال و پرتودهی باشد. نتایج به دست آمده با نتایج سایر محققین مطابقت داشت (Pandey *et al.*, 1994; Bregitzer, 1992; Leifert *et al.*, 1992).

جدول ۵- مقایسه میانگین اثرمتقابل رقم، جنین و پرتو برای صفات مختلف باززایی.

Table 5. Comparison of the mean interaction effect of variety, embryo and radiation for different reproductive traits.

سرعت رشد براساس قطر (میلیمتر/روز) Growth rate based on diameter (mm/day)	سرعت رشد بر اساس وزن (گرم/روز) Growth rate based on weight (ram/day)	درصدرطوبت Moisture percentage	درصد باززایی Regeneration percentage	پرتو Irradiation	جنین Embryo	رقم Cultivar
0.06847^{b}	0.0235^{c-g}	80.88^{a-c}	100.0^{a}	0	Mature	Nemat
0.04582^{b-d}	0.0277^{b-f}	74.31^{a-f}	70.0^{bc}	20		
0.04118^{cd}	0.0246^{c-g}	73.89^{a-g}	46.0^{d}	30		
0.00392^{f-j}	0.0301^{a-e}	67.85^{b-i}	23.0^{ef}	40		
-6.8480^{e-j}	0.0365^{a-c}	61.91^{d-j}	0.0^{g}	50		
-0.00880^{i-k}	0.0410^{ab}	48.06^{j}	0.0^{g}	60		
0.04409^{b-d}	0.0237^{c-g}	77.36^{a-e}	76.6^{b}	0	Immature	
0.02529^{d-f}	0.0273^{b-f}	72.08^{a-h}	36.6^{de}	20		
0.02892 $^{c-e}$	0.0320^{a-e}	65.19^{c-i}	26.6^{ef}	30		
0.02467^{d-g}	0.0290^{a-f}	68.70^{b-i}	13.3^{fg}	40		
0.00070^{g-j}	0.0315^{a-e}	64.17^{c-j}	0.0^{g}	50		
-0.00597^{i-k}	0.0345^{a-d}	51.35^{ij}	0.0^{g}	60		
0.09972^{a}	0.0163^{e-g}	85.21^{ab}	76.6^{b}	0	Mature	Tarom
0.06750^{b}	0.0142^{fg}	86.39^{a}	56.6^{cd}	20		
0.05087 ^{bc}	0.0432^{a}	60.27^{e-j}	56.6^{cd}	30		
0.02126^{d-h}	0.0367^{a-c}	55.12^{h-j}	40.0^{de}	40		
-0.01655^{jk}	0.0303^{a-e}	56.60^{g-j}	16.6^{fg}	50		
-0.00434^{i-k}	0.0194^{d-g}	75.31^{a-f}	3.33^{g}	60		
0.09213^{a}	0.0215^{d-g}	79.04^{a-d}	70.0^{bc}	0	Immature	
0.06696^{b}	0.0236^{c-g}	71.90^{a-h}	66.6^{bc}	20		
0.04088^{cd}	0.0252^{c-f}	72.30^{a-h}	53.3^{cd}	30		
0.01571^{e-i}	0.0267^{b-f}	67.78^{b-i}	46.6^{d}	40		
-0.00439^{i-k}	0.0271^{b-f}	58.27^{f-j}	26.6^{ef}	50		
-0.02582^{k}	0.0099g	67.69^{b-i}	3.3^{g}	60		

در هر ستون، میانگین‌هایی که دارای حروف مشابه هستند، اختلاف معنی‌داری با هم ندارند (P≥05.0)

In each Columns, means with the same letters have no significant difference (P≥05.0)

جدول ۶- ضرایب همبستگی بین صفات بررسی شده در مرحله پرتودهی.

Table 6- Correlation coefficients between investigated traits in the irradiation stage

	درصد باززایی Regeneration percentage	درصدرطوبت Moisture percentage	سرعت رشد بر اساس وزن Growth rate based on weight	سرعت رشد براساس قطر Growth rate based on diameter
درصد باززایی Regeneration percentage	**1**			
درصدرطوبت Moisture percentage	0.65**	1		
سرعت رشد بر اساس وزن Growth rate based on weight	-0.29 ns	-0.76**	1	
سرعت رشد براساس قطر Growth rate based on diameter	0.29 ns	0.15 ns	0.25**	1

**: معنی‌دار در سطح احتمال ۱٪، ns: غیر معنی‌دار

تعیین دز مناسب برای ایجاد جهش

برای بدست آوردن متوسط دوز کشنده (LD50) برای ارقام و جنین‌های بالغ و نابالغ از معادله خط رگرسیون در صد باززایی و پرتو گاما استفاده شد که در رقم نعمت با جنین بالغ برابر معادله زیر بود:

Y=-۱/۸۲۹X+ ۱۰۰/۷۸۶

بنابراین بر اساس معادله رگرسیون فوق دز مناسب برای ایجاد جهش در رقم نعمت با جنین بالغ ۲۶/۷۸ گری بدست آمد.

در رقم نعمت با جنین نابالغ برابر معادله:

Y=-۱/۳۰۳X+۶۸/۹۶۴

بر اساس معادله رگرسیون فوق دز مناسب برای ایجاد جهش در رقم نعمت با جنین نابالغ ۱۴/۵۵ گری برآورد شد.

در رقم طارم با جنین بالغ برابر معادله:

Y=-۱/۲۲۸X+۸۲/۵۴۴

بر اساس معادله رگرسیون فوق دز مناسب برای ایجاد جهش در رقم طارم با جنین بالغ ۴۱/۸۳ گری محاسبه شد.

در رقم طارم با جنین نابالغ برابر معادله:

Y=-۱/۰۶۹X+۸۰/۸۲۲

بر اساس معادله رگرسیون فوق دز مناسب برای ایجاد جهش در رقم طارم با جنین نابالغ ۳۵/۳۰ گری محاسبه گردید.

همان طور که از نتایج فوق نمایان است در هر دو رقم دز مناسب برای ایجاد جهش در جنین های بالغ بیشتر از جنین‌های نابالغ بود که می‌توان گفت شاید به‌دلیل در صد رطوبت بالای کالوس‌های ایجاد شده در جنین‌های نابالغ، اثر پرتو بر روی بافت کالوس بیشتر است. تفاوت موجود بین دو رقم نیز می‌تواند ناشی از اختلافات ژنتیکی باشد. اکسیژن مولکولی به‌راحتی با رادیکال های آزاد تشکیل شده از اثر پرتو، ترکیب شده و رادیکال های پراکسی را تشکیل می‌دهند. در صورتی که میزان رطوبت بذور یا بافت زیاد باشد قابلیت یونیزاسیون ذرات سریع‌تر کاهش می‌یابد. این

واقعیت برای به‌نژادگری که از این تکنیک برای ا صلاح‌نبات استفاده می‌کند، بسیار اهمیت دارد. ز یرا م یزان اک سیژن و رطوبت موجود در ماده بیولوژیک در صورتی که دقیقاً کنترل شده باشد، نتایج قابل قبول و مثبت از جهش حاصل خوا هد نمود.

باقری و همکاران (Bagheri *et al*., 2008) به منظور بهینه کردن استفاده از پرتو گاما بر روی کالوس های سوماتیک برنج، کالوس های بدست آمده از جنین بالغ لاین‌های ۱۴۵ و ۱۴۷ توسط پرتوگاما حاصل از کبالت ۶۰ با دزهای ۰، ۲۰، ۴۰، ۶۰، ۸۰ و ۱۰۰ گری پرتوتابی نمودند. نتایج نشان داد که درصد زنده مانی و باززایی با افزایش دز پرتو گاما کاهش یافت. با محاسبه LD50 ، دز مناسب پرتو گاما با روش رگرسیون خطی ساده برای هر یک از لاین های ۱۴۵ و ۱۴۷ به ترتیب ۸۲/۴۳ و ۹۸/۴۰ گری محاسبه گردید. برای القاء جهش با استفاده از پرتو در گیاه سیب زمینی مطالعاتی انجام شد که دزهای متفاوت پرتو گاما در شرایط کشت بافت بر روی قطعات گیاهی، تفاوت معنی‌داری با هم داشتند (Ahloowalia, 1997). برای القاء جهش با استفاده از پرتو، نوع ژنوتیپ‌های برنج و محیط کشت باززایی تأثیرگذار بود (Monirul Islam *et al*., 2005). در مطالعه باقری و همکاران (Bagheri *et al*., 2017) در بررسی مناسب ترین دز پرتو گاما جهت ایجاد تنوع ژنتیکی دو رقم بومی برتج، با افزایش دز پرتو گاما میزان رشد در هر دو رقم کاهش یافت، به‌طوریکه کاهش رشد رابطه خطی با شدت دز داشت. بر اساس نتایج به دست آمده، دزهای ۳۲۷ و ۲۸۷ گری به ترتیب در رقم عنبربو و گرده به عنوان دز مناسب برآورد شدند. در نهایت، دزهای مناسب پرتوتابی جهت ایجاد تنوع ژنتیکی برای برنامه‌های اصلاحی از طریق جهش در محدوده دزهای ۲۵۰ تا ۳۵۰ گری در هر دو رقم پیشنهاد گردید. بابایی (Babaei, 2010) از پرتوتابی بذور ارقام تجاری و محلی برنج طارم هاشمی، سنگ طارم و نعمت با دزهای مختلف پرتو گاما از ۱۵۰ الی ۴۵۰ گری با فاصله ۵۰ گری، مشاهده نمود که در دزهای ۲۵۰ و ۳۵۰ گری تنوع بالایی در صفات ارتفاع بوته، وزن هزار دانه و عقیمی بوته به‌وجود آمد و در کل با افزایش دز، صدمات فیزیولوژیکی بیشتری در نسل اول مشاهده گردید.

نتیجه‌گیری

ژنوتیپ عامل مؤثری بر القاء کالوس و باززایی کالوس‌های تولید شده بود و درصد رطوبت نمونه گیاهی از طریق اثر بر میزان اکسیژن، مقدار تأثیر پرتو ونمونه مؤثر است. بنابراین میزان اکسیژن در نمونه می‌تواند از مهمترین عوامل تأثیرگذار بر روی اثر اشعه باشد. افزایش دز پرتو گاما باعث کاهش باززایی شد و تاثیر مثبتی بر روی باززایی نشان نداد. به دلیل این که در روش اصلاح از طریق جهش می‌توان بدون استفاده از تلاقی، ایجاد تنوع نمود و از آنجایی‌که گزینش صفت مورد نظر از طریق کشت بافت نیز می‌تواند موثر باشد، لذا به‌نژادی از طریق جهش در گیاهانی که قابلیت کشت بافت را دارند پیشنهاد می‌گردد.

References

Bagheri, L., Amiri-Khah, R., Noori, M., & Mozafari, K. 2017. Effect of gamma irradiation on growth and determine optimum dose in order to induce genetic variation in landrace rice (*Oryza sativa* L.) cultivars. **Journal of Crop Breeding,** 9(21), 130-138. **[In Persian]**.

Farsi, M., & Bagheri, A. 2004. Principles of Plant Breeding. Jdm Press. **[In Persian]**.

Bagheri, L., Mosleh, E., & Fatolahi, H. 2008. Using gamma rays to induce mutations in the somatic callus of rice (*Oryza sativa*). The Second National Congress on Nuclear Technology Application in Agricultural and Natural Resource Sciences. Karaj, Iran. [In Persian].

Ahloowalia, B. S. 1997. In vitro radiation induced mutagenesis in potato. In: The impact of biotechnology in agriculture. Sangwan RS, Sangwan Noreel BS (Eds). Klumer Academic publisher, Dordrecht, Netherlands, 39-46. 10.1007/978-94-009-0587-0_4

Anonymous. 1995. Induced mutations and molecular techniques for crop improvement. Proc. FAO.IAEA symposium, Vienna 1995. IAEA, Vienna.

Arulbalachandran, D., Mullainathan, L., Karthigayan, S., Somasundaram, S. T., & Velu, S. 2010. Genetic variation in mutants of black gram (*Vigna mungo* (L.) Hepper) evaluated by RAPD Markers. Journal of Crop Sciences and Biotechnology, (1), 1-6.

Asencion, A. B. 1977. Mutation breeding manual. Proc. FAO.IAEA symposium, Vienna 1985. IAEA. 9201150776

Babaei, A. R. 2010. Radio sensivity studies of morpho-physiological characteristics in some Iranian rice varieties (*Oryza sativa* L.), In M_1 generation. African Journal of Agricultural Research, 5, 2124- 2130. 10.5897/AJAR10.234

Basri, M. 2005. Nuclear techniques used in agricultural research in turkey. Ankara nuclear agriculture and animal sciences research center. https://inis.iaea.org/search/search.aspxorig_q=RN:31000907

Bregitzer, P. 1992. Plant regeneration and callus type in barley: Effects of genotype and culture medium. Crop Science, 32, 1108-1112. https://doi.org/10.2135/cropsci1992.0011183X003200050007x

Bronzema, E. B. F., Redig, P., Oostveen, W. J. F., Onckelen, H. A., & Lammeren, A. A. M. 1996. Uptake and biochemical analysis of 2,4-D in cultured zygotic embryos of *Zea mays* L. Plant Physiology, 149, 363-371. 10.1016/s0176-1617(96)80135-0

Da Luz, V. K., de Oliveira, V. F., Maltzahn, L. E., & Venske, E. 2020. Mutation Breeding for Rice Grain Quality: Aspects, Considerations, and Promising Results. In: Costa de Oliveira, A., Pegoraro, C., Ebeling Viana, V. (eds) The Future of Rice Demand: Quality Beyond Productivity. Springer, 1-10. https://doi.org/10.1007/978-3-030-37510-2_15

Gasol, S. S., Das, A., Gopal, J., Minocha, J. L., Chopra, H. R., & Dhaliwal, H. S. 2001. *In vitro* induction of variability through radiation for late blight resistance and heat tolerance in potato. Plant breeding and genetics section. joint FAO.IAEA division international atomic energy agency wagramer strasse 5 P.O. Box 100 A-1400 Vienna, Austria, 1-8. https://www.osti.gov/etdeweb/biblio/20181058

Gholami, A. A., & Tarinejad, A. 2018. Callus induction and regeneration of bread wheat cultivars from Different explants, Journal of Cell & Tissue, 9(1), 37-56.

Hagio, T., Ichiri, S. S., & Yamada, T. 2002. Efficient plant regeneration through morphogenesis in Japanese commercial variety of wheat, *In Vitro* Cell Development of Biology, 38, 1394-1396.

Lapade, A. G., Veluz, A. M. S., Marbella, L. J., Barrida, A. C., & Rama, M. G. 2002. Mutation breeding in vegetatively propagated crops in the Philippines. Philippine nuclear research institute. Commonwealth avenue, Diliman, Quezon City. 1- 10. https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-94-017-0956-9_6

Leifert, C., Pryca, S., Lumsden, P. J., & Waites, W. M. 1992. Effect of medium acidity on growth and rooting of different plant species growing in vitro. Plant Cell Tissue Culture, 30, 171- 179. https://link.springer.com/article/10.1007/BF00040019

Micke, A., Donini, B., & Maluszynski, M. 1991. Induced mutations for crop improvement. Gamma field symposia No.30. Inst. of radiation breeding, NIAR, MAFF, Japan, 1- 21. Corpus ID: 89223076

Monirul Islam. M., Mahatalat A., & Debabrata, M. 2005. *In Vitro* Callus Induction and Plant Regeneration in Seed Explants of Rice (*Oryza Sativa* L.). Research Journal of Agriculture and Biological Sciences, 1(1), 72- 75. https://www.researchgate.net/publication/266456925

MVD. 2018. Joint FAO/IAEA Mutant Variety Database. International Atomic Energy Agency, Vienna. Available at: http://mvd.IAEA.org (accessed April 2021).

Novak, F. J. 1991. Plant tissue culture techniques for mutation breeding. Joint FAO. IAEA programme IAEA laboratories-seibersdorf, Austria Plant Breeding, 127- 132. https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-319-90698-0_6

Omiya, H., & Ken, I. 2004. Improvement of crop productivity and mutation. Institute of radiation breeding NIAS Gamma field symposia number, 43 ISSN 0435-1096. https://openlibrary.org/books/OL17725516M/Improvement_of_crop_productivity_and_mutation

Pandey, S. K., Ramesh, B., & Gupta, P. K. S. 1994. study on effect on genotype and culture medium on callus formation and plant regeneration in rice (*Oryza sativa* L.). Indian Journal of Genetic, 54 (3), 293- 299.

Rashed, M., Abou Deif, M., Abdel Hady, A., & Fahmy, K. H. 2000. Effect of gamma irradiation on maize embryo culture regenerated plants. 8th. Conf. Agric. Dev. Res. Fac. Agric. Ain Shams Univ. Annal. Agriculture Science, 2, 765, 0570- 1783. https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20043097457

Snustad, D. P., & Simmons, M. J. 2015. Principles of genetics. 130-138. https://books.google.com/books/about/Principles_of_Genetics.html?id=NBB0CgAAQBAJ

Soeranto, H., Sobrizal, I., & Manurung, S. 2002. Biotechnological approach in crop improvement by mutation breeding in Indonesia. Proceeding of the workshop on plant mutation breeding. 20-24 August 2001, Bangkok, Thailand, 56- 67. https://www.osti.gov/etdeweb/biblio/20300524

Stadler, L. J. 1930. Some genetic effects of X-rays in plants. Heredity, 21, 3-19. https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jhered.a103249

Sukekiyo, Y., & Kimura, Y. 1991. Somaclonal variation in protoplast-derived rice plants. Gamma Field Symposia No.30. Inst. of radiation breeding, NIAR, MAFF, Japan, 43- 58.

Yan, L., Li, X., & Wu, D. 2010. The comparison in tissue culture ability of mature embryo in different cultivars of rice, Agricultural Sciences in China, 840-846.

Yu, G., Wang, J., Miao, L., Xi, M., Wang, Q., & Wang, K. 2019. Optimization of mature embryo-based tissue culture and *Agrobacterium*-mediated transformation in model grass *Brachypodium distachyon*, Internationl Journal of Molecular Science, 20(21), 5448.

Zhen, H. R. 2001. *In vitro* technique for selection of radiation induced mutants. Plant breeding and genetics section joint FAO.IAEA division international atomic energy agency wagramer strasse 5 P.O. Box 100 A-1400 Vienna, Austria. IAEA-TECDOC-1227. XA0101549-ISVJ