

بررسی اثر جهش ژنتیکی پرتوهای لیزر روی صفات زراعی و DNA در نخود زراعی (*Cicer arietinum* L.)

ملیحه یوسفی سروشک^۱، حسین دشتی^{۲*}، محمدرضا بی همتا^۳ و محمد خانزاده^۴
۱. دانشجوی کارشناسی ارشد اصلاح نباتات، دانشگاه ولی عصر (عج) رفسنجان
۲. استاد، گروه ژنتیک و تولید گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ولی عصر (عج) رفسنجان
۳. استاد گروه زراعت و اصلاح نباتات، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج
۴. استادیار گروه فیزیک، دانشگاه ولی عصر (عج) رفسنجان
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۴/۲۳ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۸/۲۳)

چکیده

تنوعی که در موجودات زنده اعم از گیاه و جانور وجود دارد ناشی از جهش (موتاسیون) های طبیعی در سطح DNA و در پی نوترکیبی و انتخاب است که در طی میلیون ها سال رخ داده است. هدف از انجام این آزمایش بررسی امکان ایجاد تغییر ژنتیکی در گیاه نخود با استفاده از پرتوهای لیزر است. پرتوهای لیزر با نفوذپذیری بالایی که دارند باعث ایجاد تغییرات ریخت شناختی (مرفولوژیک) و فیزیولوژیک در گیاهان می شوند. در این آزمایش پرتوهای لیزر ND: YAG با طول موج ۵۳۰ نانومتر، لیزر هلیوم نئون با طول موج ۶۳۲ و لیزر UV با طول موج ۳۰۸ نانومتر در مدت زمان های مختلف روی بذر نخود رقم ILC482 به کار برده شد. پس از پرتوتابی و کاشت بذرها (M₁)، تا زمان برداشت صفات: روز تا جوانه زنی، گلدهی و غلاف دهی، درصد جوانه زنی، شمار ساقه های دارای غلاف، شمار کل غلاف ها، شمار غلاف های خالی و پر، شمار بذر در بوته، وزن صدانه، ارتفاع بوته، وزن خشک بوته و عملکرد دانه اندازه گیری شد. بذرهای تولیدی از تیمارهای پرتوتابی شده همراه با شاهد در نسل بعد (M₂) کشت و صفات بالا دوباره اندازه گیری شدند. نتایج در نسل اول نشان داد، در سه صفت (ارتفاع بوته، شمار غلاف های خالی و وزن خشک) تفاوتی بین شاهد و تیمارهای پرتوتابی شده وجود نداشت. اما در دیگر صفات در تیمارهای مختلف تغییراتی نسبت به شاهد در نسل اول و دوم به وجود آمد. به طور کلی پرتوتابی موجب کاهش میزان صفات نسبت به شاهد شد. در ضمن بررسی های مولکولی رخداد جهش را در سطح DNA توسط اشعه لیزر اثبات کرد.

واژه های کلیدی: جهش، لیزر، نخود، DNA.

Mutagenesis of laser radiation on DNA and agronomic traits in chickpea (*Cicer arietinum* L.)

Maliheh Usefi¹, Hossein Dashti^{2*}, Mohammadreza Bihamta³ and Mohammad Khanzadeh⁴

1. M.Sc. student of Plant Breeding, Vali-e-Asr university of Rafsanjan, Iran

2. Professor, Department of Genetics & Plant Production, Vali-e-Asr university of Rafsanjan, Iran

3. Professor of Plant Breeding, Department of Agronomy and Plant Breeding, University College of Agriculture & Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran

4. Assistant Professor, Department of Physics, Vali-e-Asr university of Rafsanjan, Iran

(Received: Jul. 13, 2016 - Accepted: Nov. 13, 2016)

ABSTRACT

The variation that exists within living plants and animals, is the result of natural mutation at the DNA level, with subsequent recombination and selection occurring, much of it over millions of years. The aim of this study is to create genetic changes in chick pea plants using laser radiation. Laser radiation can cause changes (morphological and physiological) in plants with their high permeability. In this experiment, laser lights: ND:YAG with a wavelength of 530 nm, helium-neon laser with a wavelength of 632 and UV laser with a wavelength 308 nm were used on seed of "ILC482" variety of chickpea. After irradiation and planting the seeds (m₁), characters: days to germination, days to flowering and podding, percent of germination, total number of pods, number of stem, number of empty and full pods, number of seeds, 100 KW weight, plant height, plant dry weight and grain yield per plant were measured. M₁ seeds and control were planted in the next generation (M₂) and above traits were measured. At the first generation the results showed that in the three traits (height, number of empty pods and dry weight) there is no difference between treatments. But in other characters, the treatments were differed in compared to control at first and second generation. In general, radiation reduced the characters in comparison to control. Molecular analysis confirmed the mutations occurred in DNA by the laser radiation.

Keywords: ChickPea, DNA, laser, mutation.

* Corresponding author E-mail: dashti@vru.ac.ir

مقدمه

نخود زراعی (*Cicer arietinum* L.) گیاهی یکساله و دیپلوئید با $2n=16$ کروموزوم است که n کروموزوم آن حاوی 1×10^9 جفت باز DNA می‌باشد (Rubio et al., 2004). این گیاه به‌عنوان گیاهی سازگار به مناطق نیمه‌خشک در محدوده گسترده‌ای از شرایط محیطی مناطق گرمسیری تا سردسیری قابل کشت و کار است (Majnoon Hossini, 2008). نخود در زمرة سومین حبوبات مهم جهان با تولید جهانی معادل ۸ میلیون تن است. ایران جز ۴۲ کشوری است که با میانگین عملکرد ۴۰۷ کیلوگرم به کشت و کار نخود می‌پردازد. استان‌های کرمانشاه، لرستان، آذربایجان غربی و شرقی، کردستان، همدان و خراسان مهم‌ترین استان‌های تولیدکننده نخود هستند (Parsa & Bagheri, 2008). به‌طور کلی میزان عملکرد نخود در ایران پایین است (FAO, 2010). پایین بودن عملکرد نخود در ایران را به استفاده از رقم‌های کم محصول و حساسیت آن به تنش‌های زنده و غیرزنده محیطی چون سرما در کشت‌های پاییزه و گرما و خشکی در کشت‌های بهاره نسبت داده‌اند (Habibpour mehraban et al., 2014). تولید و معرفی رقم‌های با قابلیت و ظرفیت تولید بالا و مقاوم به تنش‌های محیطی اعم از زنده و یا غیرزنده از وظایف اصلاح نباتات است. مهم‌ترین ابزار و ماده خام اصلاح نباتات وجود تنوع ژنتیکی در ذخائر توارثی (ژرم پلاسما) گیاهی است. تنوع از راه‌های مختلفی به وجود می‌آید که منشأ اصلی آن جهش (موتاسیون) است.

تنوعی که در موجودهای زنده اعم از گیاه و جانور وجود دارد ناشی جهش‌های طبیعی در سطح DNA و در پی نوترکیبی و انتخاب است که در طی میلیون‌ها سال واقع شده است. فراوانی جهش‌های طبیعی در حدود 10^{-6} است که اغلب آن‌ها مغلوب و نامطلوب هستند و آلل‌های جدید اغلب در طبیعت باقی نمی‌مانند. جهش‌های طبیعی در اصلاح نباتات پیشرفته تأثیر چندانی ندارند، لذا متخصصان اصلاح نباتات پس از سال‌های ۱۹۲۰ که نتیجه جهش‌زایی اشعه X در مگس سرکه و جو ثابت شد به‌سرعت از جهش‌القایی در اغلب گیاهان زراعی در برنامه‌های اصلاحی استفاده کردند. هدف از جهش در اصلاح

نباتات ایجاد تنوع ژنتیکی از راه افزایش فراوانی جهش درون گونه و انتخاب آلل‌های جدید است. به‌طور کلی فراوانی جهش از دو راه پرتوتابی و استفاده از مواد شیمیایی روی مواد گیاهی افزایش می‌یابد. از بین پرتوها، استفاده از اشعه‌های گاما و X در ایجاد جهش و تولید رقم (واریته)‌های جدید در گیاهان با موفقیت‌هایی همراه بوده (Brown & Caligari, 2008). سازوکار جهش‌زایی این اشعه‌ها و همچنین ذرات آلفا و غیره از راه شکستن پیوندهای شیمیایی ترکیب‌های شیمیایی یاخته و تبدیل ترکیبی به ترکیب دیگر است (Sadrabad Haghghi et al., 2002). یکی از اندام‌های گیاه که در جهش‌زایی القایی بیشتر مورد توجه اصلاح‌گران بوده بذر است زیرا دامنه گسترده‌ای از شرایط فیزیکی مانند آبکشدگی، غرق شدن در مایع، گرما، یخ‌زدگی و سطوح مختلف اکسیژن را تحمل می‌کند و می‌توان آن‌ها را به‌آسانی در معرض جهش‌زا (موتاژن)‌های زیادی قرار داد. اما بذرهای تیمار شده با جهش‌زا مانند دیگر بافت‌های گیاهی، نتایج مختلفی را ممکن است تولید کنند که شامل جهش نیافته‌ها (مانند گیاهان مادری)، جهش‌های واقعی که در همه گیاه بروز می‌یابد و شیمیر که بخشی از گیاه را در بر می‌گیرد. جهش‌یافته‌های به‌دست‌آمده از جهش یا به‌طور مستقیم به‌عنوان یک نژادگان یا ژن‌نمون (ژنوتیپ) سودمند استفاده می‌شوند و یا به‌عنوان والدین در برنامه‌های اصلاحی برای تلاقی‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرند. از آغاز اصلاح از طریق جهش تاکنون بیش از ۲۲۵۰ رقم در سراسر جهان از راه جهش آزاد شده‌اند که ۷۰ درصد آن‌ها رگه (لاین)‌هایی هستند که به‌طور مستقیم از جهش‌یافته‌ها به دست آمده‌اند. بیشترین رقم‌های جهش‌یافته در برنج و در درجه بعد به ترتیب در جو، گندم، سویا، ذرت، نخود و پنبه تولید شده‌اند این در حالی است که تنها ۶۶ رقم میوه جهش‌یافته آزاد شده است (Brown & Caligari, 2008). اغلب جهش‌یافته‌ها مربوط به پا کوتاهی، مقاومت به بیماری‌ها، مقاومت به تنش‌ها، مقاومت به علف‌کش‌ها و بهبود کیفیت دانه و روغن بوده است. امروزه یکی از روش‌های فیزیکی که برای بهبود کیفیت مواد گیاهی کشت‌شده استفاده می‌شود،

نتیجه گرفتند که پرتوهای گاما در مقایسه با لیزر برای ایجاد تنوع ژنتیکی در گلرنگ مؤثرتر هستند (Kumar & Srivastava, 2010). در سال ۱۹۶۲ نتایج نخستین تحقیق علمی روی کاربرد لیزر یاقوت قرمز در علم زیست‌شناسی (بیولوژی)، انتشار یافت (Bessis *et al.*, 1962). این گزارش باعث افزایش کاربرد لیزر در بررسی‌های زیست‌شناسی یاخته‌ای (Amy & Storb, 1965) تشریح جزئی ساختارهای ریزیاخته‌ای (Weber *et al.*, 1989) و تشریح و تجزیه کروموزوم‌ها (Weber *et al.*, 1991) شد. در اواخر دهه ۱۹۶۰ محققان در نتایج بررسی‌های خود بیان کردند، پرتوهای لیزر توانایی آسیب‌رسانی به کروموزوم‌ها را نیز دارند (Berns *et al.*, 1969). پرتوهای یون‌ساز از جمله پرتوگاما، با ورود به درون بافت و یاخته رادیکال‌های آزاد را در یاخته تولید می‌کنند و بسته به شدت پرتو، تغییر مثبت و یا منفی در فرآیندهای شکل‌گیری (مورفو ژنسیس)، فیزیولوژیک و بیوشیمیایی در گیاهان ایجاد می‌شود (Wi *et al.*, 2007). نتایج یک آزمایش روی گیاه خلر (*Lathyrus sativa* L.) نشان داد، پرتو هلیوم نئون با طول‌موج ۶۳۲/۸ نانومتر می‌تواند ابزار مؤثری برای افزایش تغییرپذیری صفات زراعی باشد (Ritambhara and Girjesh, 2013). از نور لیزر هلیوم نئون با طول‌موج ۶۳۲ نانومتر می‌توان به عنوان یک عامل فیزیکی برای افزایش مقاومت به بیماری ساق سیاه^۱ در کلزا استفاده کرد (Starzycki *et al.*, 2005). آزمایشی روی تحمل به تنش شوری گندم با استفاده از Nd:YAG با طول‌موج ۵۳۲ نانومتر و دو لیزر قرمز نیمه منسجم با طول‌موج ۶۶۰ و اشعه مادون قرمز با طول‌موج ۹۸۰ نانومتر انجام شد. نتایج این آزمایش نشان داد، استفاده از اشعه لیزر نیمه منسجم به‌عنوان یک تیمار، می‌تواند به‌طور قابل‌توجهی تحمل گندم را به تنش شوری نسبت به شاهد افزایش دهد (Ferdosizadeh *et al.*, 2013; Podlensy, 2002).

نشانگر (مارکر)های مولکولی مبتنی بر DNA از ابزارهای با کارایی بالا در جهت تشخیص چندشکلی (پلی‌مورفیسم) در سطح DNA و اثبات رخداد جهش

پرتوتابی توسط نور لیزر است (Podlesny & Stochmal, 2004). نور لیزر ویژگی‌هایی چون درخشندگی بالا، تک‌خطی و جهت‌دار بودن، پهنای نوار (باند) باریک و همدوست دارد لذا به نظر می‌رسد چنانچه تغییر ژنتیکی سودمندی توسط لیزر ایجاد شود این تغییر را می‌توان به‌صورت کنترل‌شده و اختصاصی برای تغییر مناطق خاصی از DNA به‌کار برد. نور لیزر دو نوع است: ۱- لیزر پالسی (مانند لیزر UV)، ۲- لیزر پیوسته (مانند لیزر He-Ne و ND:YAG).

نور لیزر با شدت کم، هنگامی که روی بذرها، نهال‌ها و گیاهان استفاده می‌شود به‌عنوان یک محرک زیستی عمل می‌کند (Muszynski & Gadyszewska, 2008) و بیشترین کاربرد آن در کشاورزی به‌صورت تیمار بذر پیش از کاشت است. به‌علت ویژگی‌های منحصربه‌فردی که تنها در نور لیزر وجود دارد امروزه استفاده از آن در علوم مختلف مورد توجه قرار گرفته است. بررسی‌ها نشان داده است، لیزرهای He-Ne و دی‌اکسیدکربن تأثیر مثبتی در افزایش سرعت رشد گیاه و فرآیند سوخت‌وساز (متابولیسم) آن‌ها دارند. لیزرهایی که به‌طور عمده استفاده می‌شوند از نوع لیزرهای کم‌توان‌اند که در ناحیه مرئی نور تابش می‌کنند (Chen *et al.*, 2005). در آزمایشی دانه‌های گندم (دوروم) را در معرض سه نوع لیزر هلیوم نئون (He-Ne)، دیود (Diod) و ان دی یگ (Nd-YAG) با طول‌موج‌های به‌ترتیب ۶۳۲ نانومتر، ۶۵۰ نانومتر و ۵۳۲ نانومتر قرار دادند و صفات درصد جوانه‌زنی، رشد اولیه و مقاومت در برابر عفونت‌های قارچی گندم را در شرایط آزمایشگاهی بررسی کردند. نتایج به‌دست‌آمده از این آزمایش نشان داد، لیزرهای He-Ne و Diod درصد جوانه‌زنی را ۹۵ و ۹۳ درصد نسبت به شاهد افزایش و عفونت قارچی را به‌طور معنی‌داری نسبت به شاهد کاهش داد. (Yasemin *et al.*, 2013). آزمایشی که به‌منزله مقایسه ظرفیت تغییرپذیری ژنتیکی پرتوهای لیزر و گاما روی یاخته‌های بدنی (سوماتیکی) و جنسی (گامتی) گلرنگ انجام شد نشان داد، ناهنجاری‌های کروموزومی (چسبندگی، تجمع‌های چندگانه، پل) ایجادشده در تقسیم‌های میوز و میتوز توسط پرتوهای گاما بیش از لیزر است لذا محققان

آزمایشگاه لیزر گروه فیزیک دانشگاه ولی عصر رفسنجان انجام شد. بدین گونه که شمار بیست بذر تحت تیمار 'ND:YAG10، شمار ۳۵ بذر تحت هر یک از تیمارهای 'He-Ne5، 'He-Ne10 و 'He-Ne15، شمار ۳۵ بذر تحت هر یک از تیمارهای UV۲، UV3 و UV4 قرار داده شدند.

کاشت

بذرهای پرتودیده توسط هر تیمار به اضافه تیمار شاهد (بدون پرتو) درون گلدان با هفت تکرار کشت شدند به جز 'ND:YAG10 که در چهار تکرار کشت شد (در هر گلدان پنج بذر). گلدانها در محیط مزرعه نگهداری و آبیاری شدند و صفات: شمار روز از کاشت تا جوانه زنی (سبز شدن) و گلدهی، ارتفاع ساقه، شمار شاخه، تاریخ غلافدهی، درصد جوانه زنی، درصد از بین رفته ها و شمار بوته های باقی مانده، شمار کل غلافها در بوته، شمار غلافهای پر، شمار غلافهای خالی، شمار بذر در بوته، وزن خشک گیاه در هر بوته، وزن صدانه و عملکرد دانه در بوته اندازه گیری و با شاهد مقایسه شدند. در نهایت بذرهای هر تیمار در کل آزمایش جداگانه برداشت شد (M_1) و در نسل بعد بذرهای هر بوته جداگانه در مزرعه کشت شدند (M_2) و صفات بالا اندازه گیری شد.

بررسی تغییرات ژنتیکی ناشی از جهش با استفاده از

نشانگرهای مولکولی RAPD

برای این منظور بوته هایی از تیمارهای 'He-Ne5 (دو بوته) و یک بوته از هریک از تیمارهای 'UV3 و 'UV4 از نسل اول (M_1) به روشی که بعد توضیح داده می شود، انتخاب شدند و پس از استخراج DNA از آنها به همراه شاهد با استفاده از شش آغازگر ده نوکلئوتیدی تجزیه RAPD شدند. DNA ژنگانی (ژنومی) از بافت برگ های جوان به روش CTAB بر پایه روش Murry & Thompson (1980) استخراج شد. حجم واکنش PCR ۲۵ میکرولیتر شامل ۱/۵ میکرولیتر ($MgCl_2$ (25mM)، ۲/۵ میکرولیتر بافر 10x، ۱ میکرولیتر dNTP (10mM)، ۱ میکرولیتر آغازگر (۱۰ میکرومولار)، ۵ میکرولیتر DNA الگوی ۵ نانوگرم

هستند. RAPD از نشانگرهایی است که می تواند تغییر DNA ناشی از جهش را که در اثر پرتوتابی و یا محیط کشت بافت (سوما و گامتوکلون) به وجود می آید تشخیص دهد (Ehsanpour *et al.*, 2007; Khoddamzadeh *et al.*, 2010).

در زمینه رخدادهای جهش (تغییر DNA) در پرتوتابی لیزر در گیاهان از جمله نخود اطلاع زیادی در دست نیست. این پژوهش برای بررسی امکان ایجاد و کارایی ایجاد جهش ژنتیکی و تغییر پدیدگانی یا رخ نمونی (فنتوتیپی) ناشی از آن در گیاه نخود با استفاده از لیزر انجام شد.

مواد و روش ها

مواد ژنتیکی

بذر استفاده شده در این پژوهش، بذر نخود رقم ILC482 بود که از مؤسسه تحقیقات کشاورزی دیم کشور تهیه شد.

تیمارها و نحوه پرتوتابی

تیمارهای پرتوتابی و نشانه های آنها شامل:

لیزر ND:YAG با طول موج ۵۲۳ نانومتر، توان ۲/۵ میلی وات و انرژی ۲/۳۵ الکترون ولت به مدت ده دقیقه (ND:YAG10)

لیزر هلیوم نئون He-Ne با طول موج ۶۲۳ نانومتر و توان ۲/۷۷ میلی وات و انرژی ۱/۹۷ الکترون ولت به مدت زمان های ۵، ۱۰ و ۱۵ دقیقه به ترتیب (He-Ne5، He-Ne10) و (He-Ne15).

لیزر UV با طول موج ۳۰۸ نانومتر، توان ۱۷۴ میلی ژول (۱۰۰ هرتز) و انرژی ۴ الکترون ولت به مدت زمان های ۲، ۳ و ۴ دقیقه به ترتیب (UV2)، (UV3) و (UV4).

نحوه پرتوتابی

در آغاز بذرها به مدت یک دقیقه در محلول هیپوکلیت سدیم ۱ درصد ضد عفونی و با آب مقطر شستشو داده شدند. بذرها پیش از پرتوتابی به مدت ده ساعت در دمای اتاق خیسانده شدند و پس از آن تیمارهای مختلف پرتوتابی لیزر اعمال شد. پرتوتابی در

$$Ib = 1 - (2 \times |0.5 - P|)$$

شاخص تنوع یک مکان ژنی (Di) بر پایه رابطه (۲) محاسبه شد که در آن pi فراوانی i مین آل مکان ژنی است و شاخص تنوع برای هر آغازگر عبارت است از جمع Di های مکان ژنی های شناسایی شده توسط آغازگر در بین افراد نمونه مورد بررسی (Milbourne *et al.*, 2010).

$$Di = 1 - \sum pi^2 \quad (2)$$

نتایج و بحث

نتایج تجزیه واریانس داده های M₁ در قالب طرح کامل تصادفی نشان داد، برای صفات تاریخ جوانه زنی، گلدهی و غلاف دهی در سطح ۱ درصد و صفات شمار غلاف، عملکرد دانه و شمار غلاف های پر در بوته در سطح ۵ درصد اختلاف معنی داری بین تیمارها وجود دارد (جدول ۱).

مقایسه میانگین تیمارهای بررسی شده با شاهد نشان داد، میانگین تیمار He-Ne5' در هیچ کدام از صفات تفاوت معنی داری با میانگین شاهد نداشت (جدول ۲). تیمار He-Ne10' میانگین صفت شمار کل غلاف در بوته را نسبت به شاهد کاهش ولی وزن صدانه را نسبت به شاهد افزایش داد. تیمارهای UV4'، UV3'، UV2'، ND:YAG10' باعث کاهش شمار غلاف کل و شمار غلاف پر در بوته نسبت به شاهد شدند اما تیمارهای He-Ne15'، UV2' و UV3' باعث افزایش وزن صدانه نسبت به شاهد شدند. شاید دلیل افزایش وزن صدانه به علت کاهش شمار غلاف و شمار بذر در بوته باشد. به طور کلی تیمارهای مورد بررسی درصد سبز شدن را نسبت به شاهد افزایش دادند ولی تنها تیمار UV2' افزایش معنی داری را نشان داد که با نتایج دیگران که تأثیر لیزر He-Ne با زمان های ۰/۵، ۱/۵ دقیقه روی جوانه زنی گیاه خلر بررسی کردند (Ritambhara & Girjesh, 2013) همخوانی دارد. در آزمایش های دیگران تیمار He-Ne با زمان های ۱ و ۱/۵ دقیقه باعث افزایش ارتفاع گیاه خلر نسبت به شاهد شد ولی در نسل بعد تنها زمان ۱/۵ دقیقه ارتفاع بیشتر از شاهد داشت (Ritambhara & Girjesh, 2013). در این آزمایش برای صفت ارتفاع

بر میکروولیتتر، ۰/۳ میکروولیتتر آنزیم Taq(5u/μl) و ۱۳/۷ میکروولیتتر آب دو بار تقطیر شده بود. افزودن در دستگاه ترموسایکلر به صورت در آغاز، ۴ دقیقه در ۹۴ درجه و پس از آن طی ۴۳ دور ۱ دقیقه ای در ۹۲ درجه، ۱ دقیقه در ۳۵ درجه، ۲ دقیقه در ۷۲ درجه و ۵ دقیقه در ۷۲ درجه در دور آخر به عنوان بسط تکمیلی انجام شد. برای جداسازی قطعه های DNA افزودن شده، محصولات PCR روی ژل آگارز ۱/۵ درصد (به اضافه red safe) با ولتاژ ۸۰ به مدت ۲/۵ ساعت الکتروفورز شدند و پس از عکس برداری توسط دستگاه (Gel Document) نوارهای تولید شده تجزیه و تحلیل شدند.

تجزیه های آماری

تجزیه واریانس و مقایسه میانگین تیمارهای پرتوتابی شده با شاهد (کنترل) برای صفات زراعی و ریخت شناختی (مورفولوژیکی) در نسل اول در قالب طرح کامل تصادفی ساده و در نسل دوم در طرح کامل تصادفی سلسله مراتبی (تکرار/بوته/تیمار) انجام شد. تجزیه نوارهای RAPD و رسم نمودار شجره ای (دندروگرام) به دست آمده از آن ها برای بررسی و اثبات تغییرپذیری در DNA با نرم افزار Ntysis 2.2 انجام شد. برای بررسی چندشکلی بین تیمارها، به حضور و بدون حضور یک نوار به ترتیب اعداد یک و صفر داده شد و سپس ماتریس همانندی بر پایه ضریب جاکارد و رسم نمودار شجره ای به روش Complete Linkage انجام شد چون r_{coph} بیشتری داشت (Mohammadi & Prasanna, 2003).

برای هر آغازگر ضریب توان جداسازی (Rp) محاسبه شد. این ضریب بیانگر میزان کارایی هر نشانگر در جداسازی نمونه های بررسی شده است (Prevost & Wilkinson, 1999). توان جداسازی هر آغازگر بر پایه رابطه (۱) محاسبه می شود.

$$Rp = \sum Ib \quad (1)$$

که در آن Ib میزان اطلاع رسانی هر مکان ژنی (لوکوس) یک آغازگر است که میزان آن بین صفر و یک متغیر است و P نسبتی از نژادگان هاست که نوار مورد نظر را دارند.

تیماها با شاهد در نسل دوم (جدول ۴) نشان داد، همه تیماها به جز UV4 باعث کاهش وزن صدانه نسبت به شاهد شدند و همچنین همه تیماها زمان جوانه زنی (سبز شدن) را نسبت به شاهد افزایش دادند در حالی که در نسل اول تنها تیمار ND:YAG10 باعث افزایش زمان جوانه زنی نسبت به شاهد شد. بعضی از صفات مانند شمار غلاف (کل و پر) و شمار بذر در بوته که در نسل اول تحت تأثیر پرتوتابی لیزر قرار گرفته بودند در نسل دوم تفاوت معنی داری را نسبت به شاهد نشان ندادند. همانند این موضوع در نتایج آزمایش دیگران نیز دیده شد. در گیاه خلر، تیمار He-Ne مدت یک دقیقه در نسل اول ارتفاع را افزایش داد اما در نسل دوم تغییری نسبت به شاهد نشان نداد (Ritambhara & Girjesh, 2013). معنی دار نشدن تأثیر تیمارها در دیگر صفات (صفات زراعی به غیر از تاریخ سبز شدن و وزن صدانه) در این آزمایش را شاید بتوان به زیاد بودن واریانس درون تیمارها و همگن نبودن واریانس درون تیمارها در نسل دوم نسبت داد زیرا همان طور که در جدول ۵ ملاحظه می شود واریانس درون تیمارهای پرتوتابی در بسیاری از صفات نسبت به شاهد افزایش قابل توجهی داشت. تیمارهایی چون He-Ne10 و UV2 باعث کاهش شمار غلاف و شمار دانه در بوته شدند. اما این کاهش نسبت به شاهد معنی دار نبود. همان طور که اشاره شد واریانس درون تیمارها و یا دامنه تغییر صفات در نسل دوم زیاد بود (جدول ۶). لذا دامنه تغییر شدید صفات نسبت به دامنه تغییرات شاهد در نسل دوم گویای وجود و رخداد تنوع ژنتیکی ناشی از جهش زایی پرتوتابی در صفات است. بوته هایی با میزان صفات بسیار کمتر تا بسیار بیشتر از شاهد در صفات مختلف دیده می شود که قابلیت انتخاب برای بررسی های بعدی و مقایسه با شاهد و شاید انتخاب به عنوان جهش یافته برتر و سودمند را دارند. به عنوان مثال برای صفت گلدهی (DF) در تیمار He-Ne10 بوته هایی دیده شد که در ۴۵ روز به گل رفتند در صورتی که کمترین زمان گلدهی در شاهد ۸۰ روز ثبت شد. همین طور برای صفت تاریخ غلاف دهی در تیمارهای He-Ne-10، He-Ne-15، UV2 و UV3 بوته های

بوته تفاوت معنی داری بین شاهد و دیگر تیمارها مشاهده نشد. نتایج به دست آمده از تأثیر لیزر He-Ne با سه مدت زمان ۰/۵، ۱ و ۲ ساعت روی سه رقم جو بهاره نشان داد، تیمار He-Ne ۰/۵ ساعت باعث افزایش ارتفاع در هر سه رقم شد (Rybinski, 2000). تیمار ND:YAG10 باعث افزایش در صفات شمار روز از کاشت تا جوانه زنی و کاشت تا گلدهی و غلاف دهی نسبت به شاهد شد (جدول ۲) لذا این تیمار باعث دیررسی نخود شده و دیررسی نیز در نخود به خاطر رویارویی گیاه با گرما و خشکی آخر فصل صفت مطلوبی نیست.

به طور کلی تیمارهای پرتوتابی شده توسط لیزر در M1 باعث کاهش ارزش صفات نسبت به شاهد شده اند. به تغییراتی جهش گفته می شود که ناشی از تغییر در ساختار ژن ها بوده و وراثت پذیر باشند. برای مشخص شدن ژنتیکی بودن تغییر حاصل، دو آزمایش انجام شد: یکی آزمون نتاج به دست آمده از بوته های M1 بود که در آن همه بذرها بوته های هر تیمار جداگانه در یک ردیف در مزرعه کشت شد (بوته به ردیف) و همه صفات زراعی روی تک بوته ها اندازه گیری شد و نتایج در قالب طرح کامل تصادفی سلسله مراتبی (آشپانه ای) تجزیه واریانس شد که نتاج بوته های M1 به عنوان تکرار درون هر بوته M1 و بوته های M1 درون تیمارهای آزمایش آشپان گرفتند. آزمایش دیگر بررسی تغییرات در سطح DNA بود که روی DNA شماری بوته انتخابی از نسل M1 انجام شد. بوته های منتخب مورد نظر مشاهده ای بودند که در تجزیه آماری بعضی از صفات به عنوان مشاهده های پرت و غیر معمول شناخته شدند که میزان خطای استاندارد آن ها بیشتر از ۴ بود ($\frac{|t|}{\sqrt{Mse}} \leq 4$). ارزش صفات در این بوته ها بسیار بالا بود به جز در تاریخ گلدهی که یک بوته بسیار زودتر از دیگران گل داده بود (جدول ۳). از این بوته های غیر معمول DNA استخراج و به منظور بررسی تغییر پذیری در سطح DNA مورد تجزیه RAPD قرار گرفتند.

نتایج به دست آمده از تجزیه واریانس آزمون نتاج در مزرعه نشان داد (جدول آورده نشده)، تنها در صفات شمار روز از کاشت تا سبز شدن و وزن صدانه، تأثیر تیمار معنی دار بود. نتایج مقایسه میانگین

بسیار زودرس تر از شاهد دیده شدند که می‌توانند به عنوان نژادگان‌های زودرس انتخاب و در برنامه‌ها و آزمایش‌های بعدی استفاده شوند. تجزیه خوشه‌ای (کلاستر) بر پایه واریانس درون تیمارها، تیمار شاهد را به‌کلی از بقیه جداسازی کرد و نشان داد، تیمارهای پرتوتابی لیز روی نخود توانسته است تغییر ژنتیکی زیادی را اعم از سودمند و یا غیرسودمند ایجاد کند (شکل ۱).

جدول ۱. تجزیه واریانس برای صفات بررسی در نسل اول

Table 1. Analysis of variance for traits under study in the first generation (M1)

S.O.V	df	MS													
		Dw/p ¹	Gy/p	GP	% Mortality	NFP/p	NEP/p	100KW	NS/p	TNP/p	HP	STP/p	DP	DF	DG
Treatment	7	0.12 ^{ns}	2.536 [*]	274.516 ^{ns}	0.04 ^{ns}	3.002 [*]	0.148 ^{ns}	29.350 ^{ns}	2.795 ^{ns}	10.295 [*]	1.495 ^{ns}	0.482 ^{ns}	3.597 ^{**}	3.597 ^{**}	3.597 ^{**}
Error	45	0.06	0.951	140.952	0.034	0.991	0.16	17.369	1.305	3.629	3.439	0.239	1.065	1.065	1.065
CV%		14	24.29	12.78	27	22.87	27	17.809	25.387	30.480	10.513	12.359	1.556	1.800	16.346

۱. روی این صفات تبدیل جذری انجام شده است.

DW/p: Dry weight per plant, Gy/p: Grain yield per plant, GP: Germination percent, NFP/p: Number of full pod per plant, NEP/p: Number of empty pod per plant, 100KW: 100 kernel weight, NS: Number of seed per plant, TNP/p: Total pod per plant, HP: height of plant, STP/p: Number of stem with pod per plant, DP: Days to podding, DF: Days to flowering, DG: Days to germination.

جدول ۲. مقایسه میانگین تیمارهای بررسی شده با شاهد به روش LSD در سطح ۵ درصد در نسل اول

Table 2. Means comparison of treatments with control for traits under study via LSD at 5% level in the first generation (M1)

Treatment	% Seed germination	Number of full pod/plant	100KW	Number of seed/plant	Total pod/plant	Number of stems with pod	Days to podding	Days to flowering	Days to germination
Control	85.714	5.428	19.165	5.428	8.571	4.285	66.285	57.285	6.285
He.Ne5'	77.142	4.400	21.667	5.000	6.500	4.142	66.285	57.285	6.285
He.Ne10'	94.285	4.428	25.241*	4.571	5.285*	3.857	66.800	57.800	6.800
He.Ne15'	94.285	5.142	24.320*	5.142	7.428	4.142	65.875	56.857	5.857
ND:YAG10'	90.000	4.000*	24.025	4.000	5.750*	4.000	68.500*	59.500*	8.500*
UV2'	100.00*	4.000*	24.640*	4.142*	5.857*	4.000	66.000	57.000	6.000
UV3'	97.142	3.714*	25.232*	3.857*	5.000*	3.428*	66.142	57.142	6.142
UV4'	97.143	3.571*	22.232	3.714*	5.428*	3.833	65.714	56.714	5.714
LSD (5%)	13.263	1.113	4.658	1.276	2.129	0.564	1.153	1.153	1.153

* Significant at the 5% level.

* دارای تفاوت معنی‌دار در سطح ۵ درصد.

جدول ۳. نمونه‌هایی که از نظر بعضی از صفات پرت تشخیص داده شدند و برای بررسی تغییرات در DNA استفاده شدند

Table 3. The observations that was unusual data in some traits and used to study for DNA changes caused by laser radiations

Treatment	Traits							DF
	NS/p	NFP/p	NEP/p	TNP/p	Hp	Stp/p	DW/p	
He.Ne5' (1)	+	+		+	+		+	
He.Ne5' (2)	+		+					
UV4'						+		
UV3'								+

NS/p; Number of seed per plant, NFP/p; Number of full pod per plant, NEP/p; Number of empty pod per plant.

TNP/p; Total number of pod per plant, Hp; Height of plant, Stp/p; Number of stems with pod per plant DW/p; Dry weight per plant, DF; Days to flowering.

جدول ۴. مقایسه میانگین تیمارهای پرتوتابی با شاهد برای صفات مختلف در نسل دوم

Table 4. Comparison of radiation means with control for different traits in M₂

Treatment	He.Ne5'	He.Ne10'	He.Ne15'	UV2'	UV3'	UV4'	ND:YAG	control	LSD5%
Tnp/p	38.60	34.29	39.48	36.40	38.27	40.24	38.53	38.92	12.3
Fp/p	29.29	26.48	29.46	26.94	29.33	30.33	29.28	30.67	10.0
Ep/p	9.31	7.80	10.02	9.46	8.93	9.90	9.25	8.50	4.1
NS/p	29.60	26.70	29.64	28.08	29.73	30.49	29.44	30.75	10.1
Y/p	4.17	3.68	4.06	3.50	4.32	4.24	4.03	4.43	1.6
100ws/p	13.0*	12.9*	12.8*	12.3*	13.5*	13.4	12.9*	15.07	2.1
Wd/p	14.63	14.78	14.57	13.93	16.99	15.84	16.68	16.51	4.5
DF	84.62	83.16	83.96	85.42	83.92	84.45	85.28	82.17	4.0
DG	19.1*	18.1*	19.3*	17.9*	18.5*	19.2*	18.7*	14.50	3.3
Dp	90.93	89.66	88.67	88.46	88.67	91.14	91.50	89.17	6.2
PH	22.98	22.86	22.12	25.46	26.60	23.40	21.97	24.25	5.1

*: significant at 0.05 level.

*: معنی‌دار در سطح ۵ درصد.

Tnp/p: Total pod per plant, Fp/p: Full pod per/p, Ep/p: Empty pod /p, NS/p: Number of seed/p, Y/p: Yield/p, 100ws/p: 100KW, wd/p: Dry weight/p, DF: Days to flowering, DG: Days to germination, Dp: Days to podding, PH: Plant height.

الگوی نواری به دست آمده از استفاده شش آغازگر ده نوکلئوتیدی در بررسی چندشکلی ایجاد شده توسط پرتوتابی لیزر روی بذر نخود در مقایسه با شاهد نشان داد، آغازگرهای مورد استفاده در مجموع ۲۴ مکان (مکان ژنی) را در چهار فرد (بوته) شناسایی کردند و در مجموع ۸۱ نوار تولید شد (جدول ۷). آغازگرهای UBC-338-915 و UBC-611-915 با افزونش سه مکان ژنی کمترین و آغازگر UBC-577-915 با افزونش شش مکان ژنی بیشترین مکان را شناسایی کردند. از ۲۴ مکان ۱۷ مکان پلی مورف بودند (جدول ۷).

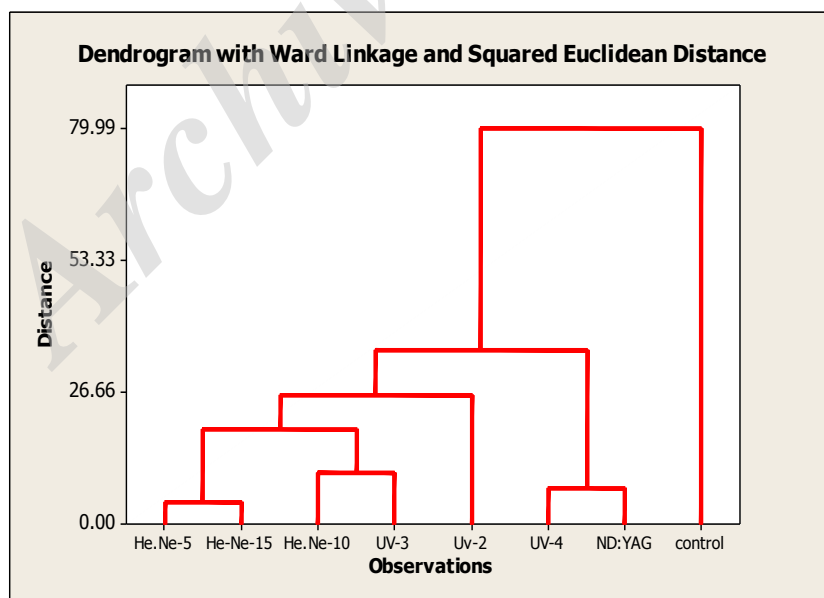
نتایج آزمایش بررسی چندشکلی ایجاد شده بین تیمارهای پرتودهی و شاهد در سطح DNA نشان داد، در بعضی از تیمارهای پرتودهی با لیزر نوارهایی ایجاد شده اند که در شاهد وجود ندارد مانند نوار ۹۰۰ و ۵۰۰ جفت بازی در آغازگر UBC-577-915 و برعکس بعضی از نوارها که در شاهد موجود ولی در بعضی از تیمارهای پرتودهی وجود ندارند مانند نوار ۴۰۰ جفت بازی در آغازگر UBC-296-915 که در شاهد وجود دارد ولی در تیمارهای He-Ne5'-۱ و UV4' وجود نداشت (شکل ۲). لذا می توان نتیجه گرفت پرتوهای لیزر موجب تغییر در توالی DNA نخود شده اند. تجزیه

جدول ۵. نسبت واریانس درون هر تیمار پرتودهی به واریانس درون تیمار شاهد برای صفات مختلف در نسل دوم

Table 5. Proportion of within variance of each treatment to within variance of control for different traits in M2

Treatment	n	Tnp/p	Fp/p	Ep/p	NS/p	Y/p	100ws/p	wd/p	DF	DG	Dp	PH
He.Ne5'	21	2.41	2.16	3.8	2.11	2.53	4.52*	2.52	8.12*	13.73*	3.79*	1.95
He.Ne10'	28	2.38	2.32	2.4	2.34	2.62	6.60*	2.36	28.4*	6.83*	11.9*	1.96
He.Ne15'	26	2.91	2.58	4.6*	2.67	2.67	3.82*	2.55	6.06*	15.21*	10.1*	1.24
UV2'	24	2.34	2.38	3.66	2.87	2.06	3.89*	2.34	9.98*	19.87*	30.2*	22.7*
UV3'	30	2.18	2.48	2.17	2.41	2.87	3.75	2.43	8.85*	11.08*	12.0*	8.0*
UV4'	21	1.67	1.73	2.58	1.72	1.61	4.26*	2.35	7.81*	10.90*	3.8*	2.91
ND:YAG10'	16	1.63	1.46	2.42	1.47	1.79	8.55*	1.79	15.39*	12.07*	5.34*	1.55
control	6	1.00	1.00	1.03	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00

n; Number of plant, Tnp/p: Total pod per plant, Fp/p: Full pod per/p, Ep/p: Empty pod /p, NS/p: Number of seed/p, Y/p: Yield/p, 100ws/p: 100KW, wd/p: Dry weight/p, DF: Days to flowering, DG: Days to germination, Dp: Days to podding, PH: Plant height.



He-Ne5': هلیوم-نئون ۵ دقیقه He-Ne10: هلیوم-نئون ده دقیقه He-Ne15: هلیوم نئون پانزده دقیقه UV2: UV دو دقیقه

UV3: UV سه دقیقه UV4: UV چهار دقیقه و control: شاهد

شکل ۱. نمودار خوشه ای به دست آمده از تجزیه خوشه ای تیمارها بر پایه واریانس درون آن ها به روش وارد و مربع فاصله اقلیدسی

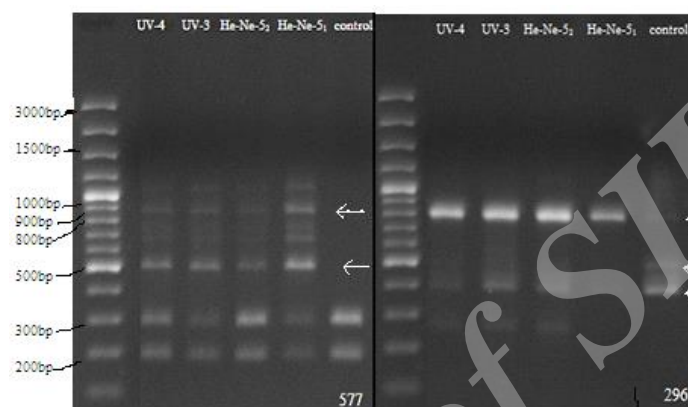
Figure 1. Dendrogram with ward linkage and squared Euclidean distance based on within variance of treatments

جدول ۶. دامنه تغییرات صفات مختلف در هر تیمار در نسل دوم

Table 6. The range of variability of different traits in second generation

Treatment	Tnp/p		Fp/p		Ep/p		NS/p		Y/p		100kw		Wd/p		DF		DG		Dp		PH	
	Min	Max	Min	Max	Min	Max	Min	Max	Min	Max	Min	Max	Min	Max	Min	Max	Min	Max	Min	Max	Min	Max
He.Ne5'	6	85	5	67	1	28	0	67	0.55	11.2	6.25	18.9	3.1	31.3	78.1	98	13.5	29.5	83	106	11.5	31
He.Ne10'	1.5	102	0	78	2	24	0	78	0	13.4	0	19.6	3.3	37.8	45	97.2	13	26	48	102	11.1	28.5
He.Ne15'	3.5	108	3.5	81	0	31.5	4.2	83	0.45	12	6.25	17.7	3.1	38.2	75.3	93	13	35	51	98	14.2	27
UV2'	8	88.5	3	76	1.5	23	3.1	76	0.2	11.4	6.7	18.2	5.45	33.9	77	94	12.5	39	22	104	15	92
UV3'	12.5	85	9.5	70.5	2.5	22	9.5	70	0.9	12.6	8.1	21.1	6	33.2	74.5	92	13	29	58	102	16.2	55
UV4'	8.5	79	7	60.5	1	23.5	7	60	0.5	8.15	6.15	20.4	3.58	30.6	78	96.1	13	29	84.5	103	15	38.5
ND:YAG10'	12	62	9	49	1.2	18	9	49	0.4	7.7	3.3	17.6	8.4	26.2	78.1	102	13	27	83.5	106	12.5	26
control	17.2	51	13.1	41	3.5	12	13.5	41	1.9	6.15	13.7	17.6	9.8	22.9	80	84.5	13.2	17	86	93	20.5	29

Tnp/p: total pod per plant, Fp/p: full pod per/p, Ep/p: empty pod /p, NS/p: Number of seed/p, Y/p: Yield/p, 100ws/p: 100KW, wd/p: Dry weight/p, DF: Days to flowering, DG: Days to germination, Dp: Days to podding, PH: Plant height.



شکل ۲. الگوی نواری نمونه‌های مورد بررسی برای آغازگرهای UBC-296-915 و UBC-577-915 در تیمارهای He-Ne5₁: هلیوم-۵ دقیقه بوتۀ ۱، هلیوم-نئون ۵ دقیقه بوتۀ ۲، UV3: UV سه دقیقه، UV4: UV چهار دقیقه و control: شاهد، M: نشانگر 100bp فلش‌ها نوارهای ۹۰۰ و ۵۰۰ جفت بازی تولید شده توسط آغازگر ۵۷۷ که در شاهد موجود نیستند و نوار ۴۰۰ جفت بازی تولید شده توسط آغازگر ۲۹۶ که در شاهد موجود ولی در تیمارهای He-Ne5₁-1 و UV4' حضور ندارد و نوار ۵۰۰ جفت بازی که در شاهد موجود و در دیگر تیمارها وجود ندارد را نشان می‌دهند.

Figure 2. banding pattern of selected samples for primers UBC-577-915 and UBC-296-915; From left to right M; ladder 100bp, UV4', UV3', He-Ne5₂', He-Ne5₁' and Control, the fleashes shows the bands are produced by radiation treatments but absent in control (as in primer 577) or presence in control but absent in UV4' and He-Ne5₁' as in primer 296.

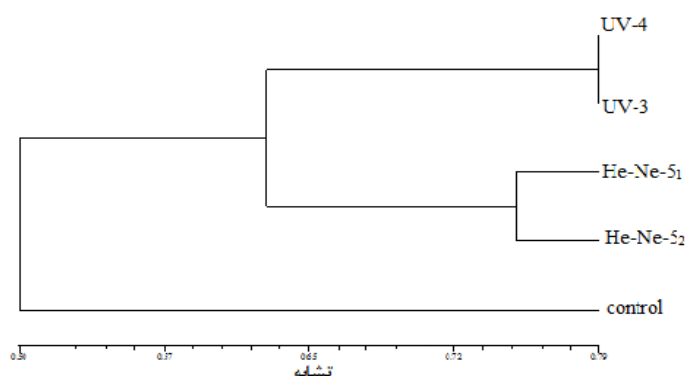
جدول ۷. نتایج تجزیه الگوی نواری مکان‌های ژنی افزونش شده توسط آغازگرهای RAPD

Table 7. Result of banding pattern analysis of amplified locus by RAPD primer

Name primer	Total Amplified bands	Num.of Amplified loci	% Polymorphic loci	Diversity Index/primer	Average of diversity index	Resolving power
UBC-338-915	6	3	100	1.34	0.19	1.59
UBC-401-915	13	4	75	1.44	0.35	2.20
UBC-296-915	12	4	100	1.79	0.35	2.81
UBC-502-915	12	4	75	2.97	0.37	4.44
UBC-577-915	23	6	66.66	0.46	0.11	0.50
UBC-611-915	15	3	0	0	0	0
Total	81	24		12.09	2.11	17.19

شناسایی می‌شوند نسبت به شاهد تغییر یابند. نتایج به دست آمده از بررسی تغییرات پدیدگانی نسبت به شاهد در M2 که نتیجه بیان ژن‌ها هستند با نتایج بررسی مولکولی در سطح DNA همخوانی دارد. در نهایت نتایج بررسی‌های مولکولی و پدیدگانی گویای رخداد جهش و تغییرات ژنتیکی وراثت پذیر در اثر پرتوتابی لیزر روی بذر نخود است.

بر پایه تجزیه خوشه‌ای، دامنه همسانی چهار تیمار پرتودهی از ۷۹ تا ۵۰ درصد متغیر بود و در ضریب همانندی ۵۰ درصد تیمارها به دو گروه جداسازی شدند که تیمار شاهد در ضریب همانندی ۵۰ درصد در یک گروه مجزا قرار گرفت (شکل ۳) که نشان دهنده این است که به طور میانگین پرتوتابی باعث شده است توالی ۵۰ درصد مکان‌هایی که توسط آغازگرها



He-Ne51: هلیوم-نئون ۵ دقیقه بوتۀ ۱، He-Ne52: هلیوم-نئون ۵ دقیقه بوتۀ ۲، UV3: UV سه دقیقه، UV4: UV چهار دقیقه و control: شاهد

شکل ۳. نمودار شجره‌ای گروه‌بندی تیمارها بر پایه ضریب همانندی جاکارد و روش پیوستگی کامل

Figure 3. The dendrogram based on jaccard coefficient and complete linkage method

نتیجه کلی

نتایج بررسی‌های پدیدگانی پس از پرتوایی بذر نخود با انواع پرتوهای لیزر در نسل اول و دوم و همچنین بررسی‌های مولکولی نشان داد که با توجه به گسترده بودن دامنه تغییرات تیمارهای پرتودهی نسبت به شاهد در صفات مختلف و ضریب فاصل، جداکننده شاهد از دیگر تیمارها در تجزیه خوشه‌ای در بررسی‌های پدیدگانی نسل دوم و ضریب همانندی جداکننده شاهد از دیگر تیمارها در تجزیه خوشه‌ای ناشی از بررسی مولکولی، لیزر توانایی بالایی در ایجاد تغییرات ژنتیکی وراثت پذیر در ژنگان نخود دارد. به رغم اینکه اغلب نتایج ناشی از جهش‌های القایی نامطلوب است لیزر می‌تواند در صورت موجود بودن

فناوری پرتودهی مناسب که بتوان جمعیت زیادی را در معرض آن قرار داد و شمار جهش‌یافته را افزایش داد، به‌یقین جهش‌یافته‌های سودمند ایجاد کند. بسیاری از صفات در نخود مورد نیاز است و یا باید تغییر یابند که در ذخائر توارثی نخود به‌احتمال زیاد موجود نیست. از جمله زودرسی و مقاومت به سرما برای کشت پاییزه در مناطق سرد که اصلاح یافتگی (اصلاح از روش جهش‌زایی) را در این گیاه توجیه می‌کند. به خاطر ویژگی‌هایی چون تک خط و همسو بودن که اشعه لیزر دارد این پرتو نسبت به پرتوهای دیگر برای این منظور قابلیت بیشتری دارد که نیازمند بررسی و ارزیابی دقیق بیشتری برای کاربردی کردن آن است.

REFERENCES

1. Amy, R. L. & Storb, R. (1965). Selective mitochondrial damage by a ruby laser. *Science*, 150, 756-757.
2. Berns, M. W. (1998). Laser scissor and tweezer. *Science American*, 278, 63-7.
3. Berns, M. W., Olson, R. S. & Rounds, D. E. (1969). In vitro production of chromosomal lesions using an argon ion laser microbeam. *Nature*, 221, 74-75.
4. Bessis, M., Gires, F., Mayer, G. & Normarski, G. (1962). Irradiation des organites cellulaires a laide dun laser a rubis. *Grade Academic Science*, 225, 1010-1012.
5. Bhat, T. A., Sharma, M. & Anis, M. (2007). Comparative analysis of mitotic aberrations induced by diethyl sulphonate (DES) and sodium azid (SA) in Fabaceae (*Vicia faba* L.). *Asian Journal of Plant Sciences*, 6, 1051-1057.
6. Brown, J. & Caligari, P. (2008). An introduction to plant breeding. Blackwell Publishing Limitd, Oxford, UK.
7. Chen, Y., Yue, M. & Wang, X. (2005). Influence of He-Ne laser irradiation on seeds thermodynamic parameters and seedlings growth of the indogotica. *Plant Science*, 168, 601-606.
8. Ehsanpour, A. A., Madani, S. & Hoseini, M. (2007). Detection of somaclonal variation in potato callus induced by uv-c radiation using rapd-pcr. *Gen.Appl.Plant physiology* 33, 3-11
9. Farsi, M. & Bagheri, A. (2009). *Principles of plant breeding*. Mashhad University Jihad Publications. (in Farsi)

10. Ferdosizadeh, L. Sadat-Noori, S. A., Zare, N. & Saghafi, S. (2013). Assessment of laser pretreatments on germination and yield of wheat (*Triticum aestivum* L.) under salinity stress. *World Journal of Agricultural Research*, 1, 5-9.
11. Food and Agriculture Organization. (2010). Food outlook, global market analysis in FAO. Retrieved May 22, 2012. From: [http://www.fao.org/food outlook.com](http://www.fao.org/food-outlook)
12. Habibpour mehranan, F., Maali, R., Zynali, H. & Dashtaki, M. (2014). Morphological variations black chickpeas by using multivariate analysis methods. *Journal of Iran Agronomy Researchs*, 1, 23-30. (in Farsi)
13. Khoddamzadeh, A. A., Sinniah, U. R., Kadir M. A., Kadzimin, S. B., Mahmood, M. & Sreeramanan, S. (2010). Detection of somaclonal variation by random amplified polymorphic DNA analysis during micropropagation of *Phalaenopsis bellina* (Rchb.f.) Christenson. *African Journal of Biotechnology*, 9(40), 6632-6639.
14. Kiong, A., Lai, A., Hussein, S. & Harun, A. R. (2008). Physiological responses of *Orthosiphon stamineus* plantlets to gamma irradiation. *Eurasian Journal of Sustainable Agriculture*, 2, 135-149.
15. Koocheki, A. & Banayan Aval, M. (2007). *Agriculture crops*. Publications Jihad Mashhad University. (in Farsi)
16. Kumar, G. & Srivastava, P. (2010). Comparative radiocytological effect gamma rays and laser rays on Safflower. *Rom Journal Plant Biological*, 2, 105-111.
17. Majnoon Hosseini, N. (2008). *Crop and cereal production*. Jihad Publishing Tehran University. (in Farsi)
18. Milbourne, D., Meyer, R., Bradshaw, J. E., Barid, E., Bonar, N., Provan, J., Powell, W. & Waugh, R. (2010). Comparison of PCR-based marker system for the analysis of genetic relationship in cultivated Potato. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 10, 204-210.
19. Mohammadi, S. A. & Prasanna, B. M. (2003). Analysis of genetic diversity in crop plant-silent statistical tools and considerations. *Crop Science*, 43, 1235-1248.
20. Murry, M. & Thompson, W. F. (1980). Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acid Res*, 8, 4321-4325.
21. Muszynski, S. & Gadyszewska, B. (2008). Representation of He-Ne laser irradiation effect on radish seeds with selected germination indices. *International Agrophysics*, 22, 15-151.
22. Parsa, M. & Bagheri, A. (2008). *Beans*. Mashhad University Jihad Publications. (in Farsi)
23. Podlensy, J. (2002). Effect of irradiation on the biochemical changes in seeds and the accumulation of dry matter in the faba bean. *International Agrophysics*, 16, 209-213.
24. Poldlensy, J. & Stochmal, A. (2004). The effect of per-sowing laser light treatment on some biochemical and physiological processes in the seeds and plants of white lupine and faba bean. *Acta Agrophysica*, 4(1), 149-160.
25. Prevost, A. & Wilkinson, M. J. (1999). A new system of comparing PCR primers applied to ISSR fingerprinting of potato cultivars. *Theoretical and Applied Genetics*, 98, 107-112.
26. Ritambhara, Sh. & Girjesh, K. (2013). Biostimulating effect of laser beam on the cytomorphological aspects of *Lathyrus sativus* L. *Annals of Plant Sciences*, 141-147.
27. Rubio, J., Flores, F., Moreno, M. T., Cubero, J. I. & Gill, J. (2004). Effect of the erect/bushy habit, single/ double pod and late/ early flowering genes on yield and seed size and their stability in chickpea. *Field Crops Research*, 90, 255-262.
28. Rybinski, W. (2000). Influence of laser beams combined with chemomutagen (MNU) on the variability of traits and mutation frequency in spring barley. *International Agrophysics*, 15, 115-119.
29. Sacata, E., Demczuk, A., Grzys, E., Proba-Biatczyk, U. & Szajsner, H. (2012). Impact of persowing laser irradiation of seeds on sugar beet properties. *Agrophysics*, 26, 295-300.
30. Sadrabadi Haghighi, R., Marashi, S. H. & Nasiri Mohalati, M. (2002). *Principles of plant breeding farm*. Publications Jihad Mashhad University. (in Farsi)
31. Starzycki, M., Rybinski, W., Starzycka & E., Pszczota, J. 2005. Laser light as a physical factor enhancing rapeseed resistance to blackleg disease. *Acta Agrophysica*, 5:441-446.
32. Weber, G., Monojembashi, S., Greulich, K. O. & Wolfrum, J. 1989. Uptake of DNA in chloroplast of (*Brassica napus* L.) facilitated by UV-laser microbeam. *European Journal of Cell Biology*, 49, 73-79.
33. Weber, G., Stanke, M., Monojembashi, S. & Greulich, K. O. (1991). Microdissection of chromosomes of *Brassica napus* at 400 x magnification with UV laser microbeam and stable transformation of higher plants. *ISPMB Congress Tucon Abstracts*, 3, 74.
34. Wi, S. G., Chung, B. Y. & Kim, J. S. (2007). Effect of gamma irradiation on morphological changes and biological responses in plants. *Micron*, 38, 553-564.
35. Yasemin, Z., Firdaws, A. Al. & Amange, F. (2013). Laser treatment may enhance growth and resistance to fungal infection of hard wheat seeds. *IOSR Journal of Agriculture and Veterinary Science*, 2(3), 47-51.