ژنتیک نوین
دوره نهم، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۳
صفحه ۳۱۲- ۲۹۹

شناسایی لاین‌های موتانت متحمل به شوری در برنج و انگشت‌نگاری آنها با نشانگر ISSR

Identification of salt tolerant mutants in rice and their fingerprinting using ISSR markers

اسدالله احمدی‌خواه*[۱]، هدا شجاعیان[۲]، محمدهادی پهلوانی[۲]، لیلا نیری‌پسند[۳]

۱- استادیار، دانشکده فناوری‌های نوین، دانشگاه شهید بهشتی تهران
۲- به ترتیب دانش آموخته کارشناسی ارشد و دانشیار، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
۳- دانش آموخته کارشناسی ارشد، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

Ahmadikhah A[*1], Shojaeian H[2], Pahlevani MH[2], Nayeripasand L[3]

1. Assistant Professor, Faculty of New Technologies, Shahid Beheshti University of Tehran.
2. MSc student and Associate Professor, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources.
3. MSc student, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University.

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: a_ahmadikhah@sbu.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۲/۵/۶- تاریخ پذیرش: ۹۳/۳/۱۸)

چکیده

شناسایی و انتخاب ارقام با خصوصیات کمی و کیفی بهبود یافته، از اهمیت خاصی در اصلاح رقم برخوردار است. موتاژن‌های شیمیایی با اثرات موتاژنی، خزانه ژنی متنوعی را در منابع گیاهی ایجاد کرده و به عنوان یک ابزار تکمیلی در فرایندهای به‌نژادی به کار گرفته می‌شوند. در این مطالعه به منظور ایجاد تنوع ژنتیکی در برنج (رقم ندا) از موتاژن اتیل متان سولفونات (EMS) استفاده شد و نقش جهش‌های حاصل از آن در بهبود تحمل به تنش شوری مورد بررسی قرار گرفت. لاین‌های موتانت نسل M_2 در مرحله گیاهچه‌ای در شرایط شوری NaCl (۱/۲- مگاپاسکال) ارزیابی شدند که منجر به شناسایی ۹ لاین متحمل به شوری شد. این لاین‌ها به همراه رقم مادری در مرحله گیاه کامل در شرایط مزرعه با اعمال شوری ۷ دسی زیمنس بر متر مربع نیز مورد ارزیابی قرار گرفتند که بر اساس شاخص تحمل به تنش (STI) سه لاین متحمل به شوری به نام‌های MT41، MT189 و MT196 شناسایی شدند. اما از نظر افت کمتر عملکرد در شرایط شوری، سه لاین موتانت MT184، MT189 و MT196 به عنوان لاین‌های متحمل‌تر به شوری شناسایی شدند. برای بررسی سطح تنوع مولکولی حاصل از تیمار جهش در لاین‌های موتانت، از نشانگرهای ISSR استفاده شد که ۵۰ درصد نشانگرها چندشکلی بین رقم مادری و لاین‌های موتانت را نشان دادند. تجزیه خوشه‌ای با روش UPGMA ژنوتیپ‌ها را به دو گروه عمده تفکیک کرد که گروه لاین‌های موتانت نسبت به گروه رقم مادری بیش از دو برابر عملکرد و شاخص تحمل به تنش را نشان داد. بر اساس این تحقیق، می‌توان دو لاین MT189 و MT196 را به عنوان لاین‌های متحمل به شوری در هر دو مرحله گیاهچه‌ای و گیاه بالغ معرفی کرد. همچنین، نتیجه‌گیری می‌شود که جهش القایی EMS تاثیر مطلوبی در ایجاد لاین‌های موتانت متحمل به شوری داشته و از نشانگرهای ISSR می‌توان برای جداسازی لاین‌های موتانت متحمل به شوری در جمعیت‌های موتانت برنج استفاده کرد.

واژه‌های کلیدی

برنج
تحمل به شوری
جهش
نشانگر ISSR
EMS

Archive of SID

مقدمه

اصلاح به کمک جهش در گیاهان زراعی ابزار موثری برای اصلاح‌کنندگان نبات مخصوصا در محصولاتی که پایه ژنتیکی محدودی دارند، می‌باشد. به طورکلی هدف از ایجاد جهش مصنوعی، تغییر یک یا چند ژن نزدیک به هم و شکستن همبستگی و افزایش کراسینگ‌اور بین ژن‌های مطلوب و نامطلوب می‌باشد (Shu and Lagoda 2007; Hase et al. 2012). جهش حداکثر تنوع قابل توارث برای عمل انتخاب را فراهم می‌کند و تنوع حاصل از جهش اگر موجب سازگاری شود، به حفظ بقای موجودات در محیط‌های متغیر کمک می‌کند (Khademian et al. 2004). اصلاح به کمک جهش مقرون به صرفه بوده وزمان اصلاح یک رقم را بدون تغییر بقیه ترکیب ژنتیکی آن کاهش می‌دهد (Micke 1999). استراتژی اصلی در اصلاح بر پایه جهش ایجاد سریع واریته‌های گیاهی سازگار با عملکرد بالاتر و کیفیت بهتر می‌باشد (Ahloowalia et al. 2004; Ilirjana et al. 2007; Mba 2013).

در گونه‌های دیپلوئید حداکثر تغییرپذیری ژنتیکی در نسل M_2 حاصل می‌شود. موتانت‌های انتخابی برای صفات مختلف در نسل M_3 تثبیت می‌شوند و پایداری فنوتیپی را نشان می‌دهند (Bughio et al. 2007). تکنیک جهش برای بهبود تقریبا تمام صفات مهم زراعی، از تحمل به تنش‌های زنده (مانند شوری، سرما، اسیدیته و ...) تا مقاومت به بیماری، از کیفیت غذایی تا بازارپسندی و از ساختمان گیاه تا پتانسیل محصول به کار گرفته شده است (Shu and Lagoda 2007; Okamura et al. 2012). تکنیک موتاسیون گاهی اوقات تنها روشی است که برای بهبود صفات همپوشان، با هدف ثابت ماندن یکی از صفات، کاربرد دارد و گاهی تنها راه برای بهبود عملکرد است و زمانی‌که بخواهند صفات مطلوب خاصی را بدون تغییر سایر خصوصیات حفظ کنند، مانند واریته‌های سنتی برنج باسمتی در هند و پاکستان، از موتاسیون استفاده می‌شود (Patnaik et al. 2006). Hase et al. (2010) از روش جهش‌زایی با پرتو برای اصلاح رنگ گل در اطلسی استفاده کردند. بسیاری از واریته‌های موتانت مانند واریته برنج یانفنگ زو در اوایل دهه ۱۹۸۰ و زفو ۸۰۲ در و اوایل دهه ۱۹۹۰ در چین برای تولید برنج زودرس آزاد شدند (Ahloowalia et al. 2004; Liu et al. 2010). چندین ژن جهش‌یافته جدید به واریته‌های تجاری برنج انتقال یافتند که نمونه آن انتقال آلل‌های موتانت *sd1* در ژاپن به واریته ریمی و در آمریکا به واریته کارلوس ۷۶ با هدف ایجاد واریته‌های پاکوتاه می‌باشد (Monna et al. 2002). یکی از موفقیت‌ها در اصلاح برنج از طریق جهش‌زایی، در پاکستان ایجاد ۴ واریته پر عملکرد و با کیفیت بهتر بوده است. رقم برنج "شاداب"، در سال ۱۹۸۷ با تیمار بذرهای رقم IR6 با موتاژن شیمیایی اتیل‌متان سولفونات (EMS) آزاد شد. پتانسیل عملکرد آن ۷ تن در هکتار و کیفیت دانه خوبی دارد (Bughio et al. 2007). در تحقیقی Khademian et al. (2004) از دو موتاژن فیزیکی (اشعه) و شیمیایی (EMS) برای اعمال تیمارهای موتاژنی در سه رقم برنج ایرانی به نام‌های طارم محلی، طارم دیلمانی و شفق استفاده کردند. ارتفاع بوته نسبت به شاهد کاهش زیادی نشان داد. میزان عقیمی خوشه در مقایسه با شاهد افزایش یافت. در نسل دوم تعداد پنجه و مقدار دانه در خوشه که از اجزای اصلی عملکرد می‌باشند در اکثر موارد افزایش یافتند. میزان عملکرد دانه به جز چند مورد استثنا در همه موارد افزایش بسیار زیادی نسبت به شاهد داشت. در نهایت سه لاین بسیار یکنواخت، پاکوتاه و زودرس در رقم طارم محلی تحت تیمارهای ۰/۱ درصد EMS و ۳۵۰ گری اشعه به دست آمد (Khademian et al. 2004). این نتایج به روشنی نشان می‌دهد که تکنیک‌های جهش ابزاری مفید و بی‌نظیر برای اصلاح گیاهان هستند.

مهمترین مواد جهش‌زای شیمیایی مورد استفاده شامل اتیل متان سولفونات (EMS)، اتیل اتان سولفونات (EES)، اتیل بوتان سولفونات (EBS)، متیل متان سولفونات (MMS)، متیل اتان سولفونات (MES)، دی اتیل سولفونات (DES)، گاز خردل، هیدرازین (HZ) و هیدروکسیل آمین (HA) می‌باشند؛ البته در بین موتاژن‌های شیمیایی، استفاده از EMS رایج‌تر است (Ahmadikhah 2008). عوامل آلکیلی مثل اتیل متان سولفونات (EMS) و اتیل اتان سولفونات (EES) یک گروه متیل یا اتیل به کربن شماره ۷ باز گوانین در رشته DNA اضافه می‌کنند. اگر باز گوانینی که تحت تاثیر عوامل آلکیلی قرار گرفته از رشته DNA جدا نشود، در جفت شدن همانند آدنین عمل کرده و می‌تواند با تیمین یا سیتوزین جفت شود که این سبب می‌شود دی نوکلئوتید GC به

Archive of SID
www.SID.ir

AT تبدیل شود (Rakshit et al. 2010). در گیاهان EMS معمولا باعث جهش‌های نقطه‌ای شده اما از دست دادن یک قطعه کروموزومی و یا حذف آن نیز می‌تواند رخ دهد (Jabeen and Mirza 2004). EMS به عنوان عامل ایجاد جهش نقطه‌ای باعث پیدایش دامنه گسترده‌ای از آلل‌های جهش‌یافته، مانند از دست دادن کارکرد ژن، به دست آوردن کارکرد جدید، تغییر کارکرد ژن و تولید جهش یافته‌های جدید با خصوصیات ویژه می‌شود. این درحالی است که جهش‌های حاصل از پرتوهای گاما، اغلب باعث حذف و اضافه شدن یک رشته نوکلئوتیدی و بروز جهش‌یافته‌های با کارکرد از دست رفته ژن‌ها می‌شوند (Naderi Shahab et al. 2007). برتری ویژه اصلاح موتاسیونی در گیاهان، امکان به دست آوردن تنوع ژنتیکی کافی و نیز بهبود گیاهان با تکثیر رویشی می‌باشد؛ به خصوص زمانی‌که هدف بهنژادگر تغییر یک یا تعداد کمی خصوصیت از یک واریته تجاری الیت باشد (Shu and Lagoda 2007).

شوری یکی از تنش‌های محیطی است که تاثیر زیادی روی محصول گیاهان زراعی دارد. تحمل به شوری مانند سایر تنش‌های محیطی در گیاهان عالی یک صفت پیچیده ژنتیکی و فیزیولوژیکی است. بیشتر فرآیندهای گیاهی که در تحمل به شوری دخیل هستند دارای توارث کمی بوده و تنوع پیوسته نشان می‌دهند و تحت تاثیر شرایط محیطی نیز هستند (Meloni et al. 2004). جهش‌زایی مصنوعی می‌تواند برای بهبود تحمل به شوری سودمند باشد. Lee et al. (2003) با استفاده از پرتوتابی لاین‌های القایی جهش یافته متحمل به شوری در برنج ایجاد کردند. Sayed et al. (2007) یک واریته موتانت به نام شو ۹۲ و دو رقم برنج موتانت از طریق اصلاح جهشی از دو واریته استاندارد IR8 و پوکالی به دست آوردند و برای دو سال جهت ارزیابی کارایی عملکرد در خاک‌های شور با EC ۷/۱ تا ۸ دسی زیمنس بر متر مورد بررسی قرار دادند. واریته موتانت شو ۹۲ به ترتیب ۴۰ و ۴۹ درصد محصول بیشتری در خاک شور نسبت به واریته‌های متحمل به شوری نونا بوکرا و پوکالی تولید کرد. همچنین در رقم IR29 (Baloch et al. 2003) و باسمتی ۳۷۰ (Saleem et al. 2007) موتانت‌های متحمل به شوری با عملکرد بالا تولید شد که نشان‌دهنده مناسب بودن جهش جهت ایجاد مقاومت به شوری است.

در سال ۱۹۹۴ نوع جدیدی از نشانگرهای مولکولی که به اختصار تکثیر نواحی بین میکروساتلایت‌ها (ISSR) نامیده شدند، معرفی و مورد استفاده قرار گرفت (Zietkiewicz et al. 1994). این نشانگرها به طور گسترده‌ای در نواحی بین میکروساتلایت‌ها در سرتاسر ژنوم پراکنده شده‌اند. آغازگرهای ISSR امکان تکثیر قطعاتی از DNA بین دو توالی میکروساتلایتی مجاور را آسان می‌سازد. کارکردن با این نشانگرها بسیار ساده است و نیازی به داشتن اطلاعات قبلی از توالی نوکلئوتیدی ژنوم مورد مطالعه نیست. تغییرپذیری بالا به همراه تکرارپذیری نشان دهنده کارآیی بالای این نشانگرها در بررسی صفات مهم زراعی می‌باشد (Blair et al. 1999). با این نشانگر می‌توان تنوع موجود در نواحی میکروساتلایتی مختلف را با استفاده از آغازگرهایی که در انتهای '5 یا '3 ناحیه تکراری طراحی می‌شوند و بخشی از ناحیه احاطه کننده آن را نیز شامل می‌شوند، ارزیابی کرد. قطعات تکثیر شده را می‌توان براساس اندازه بر روی ژل آگارز یا پلی‌اکریلامید جدا کرد (de la Torre et al. 2012). نشانگرهای ISSR چند جایگاه را به طور همزمان شناسایی و تکثیر می‌کند که برای انگشت‌نگاری، مطالعه تنوع ژنتیکی و نقشه‌یابی ژنتیکی مفید است. این تکنیک می‌تواند تفاوت میان افراد واجد قرابت زیاد را آشکار نماید. از جمله مزایای آن می‌توان به داشتن چندین جایگاه چندشکل، قابل کاربرد با تعداد زیادی نمونه و هزینه پایین اشاره کرد (Ahmadikhah 2010).

این تحقیق با هدف ایجاد تحمل به شوری در برنج (رقم تجاری ندا) با استفاده از جهش شیمیایی EMS و همچنین مطالعه تغییرات ژنتیکی ناشی از جهش القایی EMS در لاین‌های موتانت انتخابی به کمک نشانگرهای ISSR انجام شد.

مواد و روش‌ها

این تحقیق در دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان اجرا شد. در این تحقیق از رقم ندا به عنوان ماده گیاهی جهت اعمال تیمار جهش استفاده شد. لاین ندا از تلاقی بین ارقام محلی سنگ طارم با رقم اصلاح شده آمل ۳ به دست آمده است. این لاین دارای عملکرد خوب (بین ۶ تا ۷ تن در هکتار)، نسبتا دیررس (۱۰۵ روز از زمان خزانه‌گیری تا شروع ظهور خوشه)،

Archive of SID
www.SID.ir

متحمل نسبت به آفت کرم ساقه‌خوار و بیماری بلاست می‌باشد. متوسط ارتفاع آن ۱۰۳ سانتی‌متر، مقاوم به ورس، دانه دراز، دارای ۲۶/۲ درصد آمیلوز، دمای ژلاتینی شدن متوسط و بدون عطر و طعم می‌باشد. جهت اعمال جهش شیمیایی ابتدا تعداد ۲۰۰۰ بذر از رقم ندا با هیپوکلریت سدیم ۵ درصد ضدعفونی شد و سپس به مدت ۱۶ ساعت در آب مقطر خیسانیده شدند. بذرها به سه قسمت تقسیم گردید و تیمار بذرها با اتیل متان سولفونات (EMS) در غلظت‌های صفر، ۰/۰۷۵، ۰/۱ و ۰/۱۵ درصد به مدت ۱۶ ساعت انجام شد. از سیستم هوادهی جهت تماس بیشتر ماده جهش‌زا با بذرها استفاده شد. جهت جلوگیری از آسیب احتمالی ماده جهش‌زا به جنین، پس از اتمام تیمار بذرها به مدت ۳ ساعت در زیر جریان آب شسته شدند. سپس، تعداد صد بذر از هر دوز (به همراه شاهد) در سه تکرار در حوله کاغذی مرطوب در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد کشت شد. پس از سه روز تعداد بذرهای جوانه زده شمارش و میانگین درصد جوانه‌زنی برای هر دوز محاسبه شد. با توجه به LD_{50} دوزهای مختلف، دوز مناسب جهت اعمال تیمار نهایی جهش تعیین شد (Benjavad Talebi 2012; Anbarasan et al. 2013). با توجه به این معیار، دوز ۰/۱ درصد EMS به عنوان دوز مناسب جهت ایجاد جهش انتخاب شد و تعداد حدود ۲۰۰۰ بذر جدید با این دوز تیمار شدند.

جهت تعیین حد بحرانی تحمل شوری رقم مادری ندا با هدف نهایی اعمال فشار اسمزی کافی برای غربال لاین‌های موتانت نسل M_2 لازم بود تا درجه تحمل رقم ندا به شوری در مرحله جوانه‌زنی مشخص شود. برای ارزیابی درجه تحمل رقم ندا، تیمار شوری با NaCl در چهار سطح مختلف فشار اسمزی صفر، ۰/۴-، ۰/۸- و ۱/۲- مگاپاسکال به کار رفت. از معادله Kunz et al. (2004) جهت محاسبه غلظت NaCl استفاده شد.

$$C = \frac{-MPa}{1RT}$$

رابطه ۱

C= مولاریته محلول بر حسب مول برلیتر؛ I= فاکتور وان‌هوف برابر با ۱/۸؛ R= ثابت جهانی قانون گاز برابر با $۸/۳\times۱۰^{-۳}$ و T= دما برحسب کلوین

در ادامه بذرهای رقم ندا (۲۰ عدد بذر سالم برای هر تیمار) پس از ضدعفونی با هیپوکلریت ۵ درصد و شستشو با آب مقطر در حوله کاغذی در قالب طرح کاملا تصادفی با ۴ تکرار، با ۵۰ سی‌سی از هریک از محلول‌ها تیمار شده و در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور به مدت ۸ روز قرار داده شدند. صفات طول ریشه‌چه و ساقه‌چه (با استفاده از کاغذ میلی‌متری) و وزن تر گیاهچه در روز هشتم اندازه‌گیری شدند.

پس از تیمار با ماده جهش‌زا بذرهای جوانه‌دار شده M_1 در سال ۱۳۸۹ در خزانه کشت شدند. گیاهچه‌های ۳۰ روزه در زمین اصلی نشاء شدند. پس از رسیدن کامل، بذرهای نسل M_2 از ۲۱۲ لاین موتانت در شهریور همان سال به طور جداگانه برداشت شدند. با توجه به اینکه بررسی حد بحرانی تحمل به شوری در رقم ندا در مرحله جوانه‌زنی نشان داد که بهترین تیمار برای غربال لاین‌های موتانت متحمل به شوری تیمار ۱/۲- مگاپاسکال NaCl می‌باشد، بنابراین محلولی با پتانسیل فوق تهیه شد و بذرهای ۲۱۲ لاین موتانت نسل M_2 (۲۰ بذر سالم از هر لاین موتانت) پس از ضدعفونی، با استفاده از حوله کاغذی در دمای ۲۸ درجه همراه با شاهد با محلول NaCl تیمار شدند. پس از ۷ روز طول ریشه‌چه و ساقه چه و وزن تر گیاهچه‌ها اندازه‌گیری شد (Benjavad Talebi et al. 2012) و در نهایت موتانت‌های احتمالی متحمل، به مزرعه انتقال یافتند.

در اردیبهشت سال ۱۳۹۰ بذور جوانه زده نسل M_2 (۲۰ بذر) در خزانه به طور مجزا کشت شدند. پس از ۳۰ روز گیاهچه‌های لاین‌های موتانت به همراه شاهد (رقم مادری ندا) به زمین اصلی واقع در مزرعه تحقیقاتی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان انتقال داده شدند. آزمایش به صورت اسپلت بلوک اجرا شد؛ یک بلوک به عنوان شاهد (خاک طبیعی با EC ۱/۵ دسی زیمنس بر متر مربع) و یک بلوک جهت اعمال تیمار شوری (EC ۷ دسی زیمنس بر متر مربع) در نظر گرفته شد. در هر بلوک ۸ تکرار از هر ژنوتیپ نشا شد. یک هفته پس از کشت و استقرار گیاهچه‌ها در مزرعه تیمار شوری اعمال شد. جهت اعمال شوری از محلول نمک NaCl استفاده شد. با اضافه کردن تدریجی محلول نمک به صورت یکنواخت در همه نقاط بلوک تیمار، شوری در حدود ۷ دسی‌زیمنس بر مترمربع تثبیت شد. برای تداوم تیمار شوری، میزان شوری با دستگاه شوری‌سنج اندازه‌گیری و در صورت لزوم محلول نمک NaCl تا رسیدن به ۷ دسی زیمنس بر

Archive of SID
www.SID.ir

متر مربع اضافه می‌شد. در زمان‌های مناسب، خصوصیاتی همچون تاریخ خوشه‌دهی، ارتفاع بوته، تعداد پنجه، طول خوشه، عملکرد بوته، تعداد دانه کل و تعداد دانه پر در خوشه، درصد باروری خوشه، وزن تر بوته (بیوماس) و وزن ۱۰۰ دانه با در نظر گرفتن اثرات حاشیه اندازه‌گیری شدند.

DNA با استفاده از روش تغییر یافته CTAB (Ahmadikhah 2009) استخراج شد. برای تعیین کمیت و کیفیت DNA استخراجی از الکتروفورز ژل آگارز یک درصد در بافر TBE استفاده شد. برای بررسی سطح تنوع مولکولی حاصل از تیمار جهش از ۱۰ آغازگر ISSR استفاده شد (جدول۱). حجم نهایی مخلوط واکنش PCR، ۱۲ میکرولیتر در نظر گرفته شد که حاوی ۰/۸ میکرولیتر از DNA الگو (۱۰ نانوگرم بر میکرولیتر)، ۶ میکرولیتر PCR Master Mix (شرکت سیناکلون)، ۵ میکرولیتر آب دیونیزه و ۰/۲ میکرولیتر از آغازگرها (۱۰ پیکو گرم بر میکرولیتر) بود. محصولات حاصل از تکثیر به وسیله الکتروفورز در ژل آگارز ۲/۵ درصد حاوی اتیدیوم بروماید (۰/۵ میکرو گرم بر میکرولیتر) در بافر TBE تفکیک شدند. برای مشخص کردن طول قطعات از نشانگر اندازه مولکولی Ladder 100 bp استفاده شد. عکسبرداری از ژل‌ها با استفاده از دستگاه ژل داکیومنت انجام شد.

جدول۱- آغازگرهای ISSR استفاده شده در این تحقیق

ردیف	نام آغازگر	توالی ′۳-′۵
۱	ISSR1	(GA)7-RG
۲	ISSR2	(CA)7-YC
۳	ISSR3	(AG)8-T
۴	ISSR4	(AG)8-YC
۵	ISSR5	(GT)8-YC
۶	ISSR6	(AC)8-YG
۷	ISSR7	(TG)8-RC
۸	ISSR8	(AT)7-RC
۹	ISSR9	(CA)7-YG
۱۰	ISSR10	(CA)8-RC

الگوی دمایی PCR برای آغازگرهای ISSR به صورت زیر بود: ۹۴°C به مدت ۵ دقیقه؛ ۳۵ چرخه در ۹۴°C به مدت ۳۰ ثانیه، ۴۸°C به مدت ۳۵ ثانیه، ۷۲°C به مدت ۹۰ ثانیه؛ و سرانجام ۷۲°C به مدت ۵ دقیقه.

برای تجزیه آماری داده‌های کمی، از روش تجزیه واریانس در نرم‌افزار SPSS10 (Kinnear and Colin 2000) استفاده شد و مقایسه میانگین‌ها با روش دانکن انجام گرفت. شاخص تحمل به تنش (STI) برای ارزیابی واکنش تحمل ژنوتیپ‌ها به تنش شوری مورد استفاده قرار گرفت که طبق رابطه (۲) محاسبه شد (Fernandez 1992).

$$STI=\frac{Yp*Ys}{Mp^2}$$

رابطه (۲)

در این فرمول Y_P و Y_S به ترتیب میانگین عملکرد هر ژنوتیپ در محیط مساعد و تنش و Mp میانگین عملکرد کلیه ژنوتیپ‌ها در محیط مساعد می‌باشد.

باندهای حاصل از تکثیر با نشانگرهای ISSR به صورت یک (وجود باند) و صفر (عدم وجود باند) امتیازدهی شدند، سپس با استفاده از نرم افزار PopGene32 (Yeh et al. 1999) میزان چندشکلی، مقدار اطلاعات چندشکلی، فاصله ژنی نئی، شاخص اطلاعات شانون و ... محاسبه شد. میزان چندشکلی با تقسیم تعداد لوکوس چندشکل بر تعداد کل لوکوس‌ها محاسبه شد. مقدار اطلاعات نسبی نشانگرهای مولکولی از طریق محاسبه مقدار اطلاعات چندشکلی (PIC) طبق رابطه ۳ محاسبه شد (Anderson et al. 1993).

$$PIC=1-\Sigma_j^n P_{ij}^2$$

رابطه (۳)

که در آن Pij فراوانی آلل j برای نشانگر i می‌باشد که برای همه آلل‌ها (n آلل) جمع زده می‌شود. فاصله ژنی نئی (Nei 1978) بین ژنوتیپ‌ها (H) از رابطه ۴ محاسبه شد. Σ

$$H=1-\frac{N_{x,y}}{N_x+N_y}$$

رابطه (۴)

Nx,y: تعداد کل باندهای یکسان بین دو نمونه x و y؛ Nx: تعداد باندهایی که فقط در نمونه x وجود دارد؛ Ny: تعداد باندهایی که فقط در نمونه y وجود دارد. ضریب تنوع ژنی شانون (I) از رابطه ۵ محاسبه شد.

$$I=\Sigma-(P_i*\ln P_i)$$

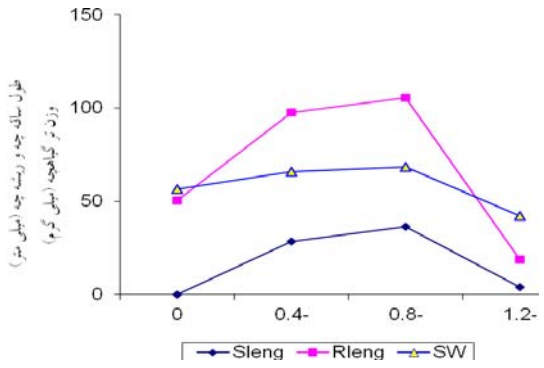
رابطه (۵)

که در آن Pi فراوانی i امین آلل در یک جایگاه معین می‌باشد.

Archive of SID
www.SID.ir

نتایج و بحث

از آنجا که هدف نهایی اعمال فشار اسمزی کافی برای غربال لاین‌های موتانت نسل M_2 حاصل از تیمار رقم فوق با موتاژن EMS، بود ابتدا می‌بایست حد بحرانی تحمل به شوری در رقم مادری ندا انجام می‌شد. نتایج تجزیه واریانس نشان داد که تیمار شوری بر طول ساقه‌چه، طول ریشه‌چه و وزن تر گیاهچه اثر بسیار معنی‌داری داشت (جدول۲). فشارهای اسمزی ۰/۴- و ۰/۸- مگاپاسکال نه تنها باعث افت خصوصیات رشد و نموی گیاهچه‌ها نشدند، بلکه آنها را تحریک نیز کردند، به طوری که میزان رشد ساقه‌چه نسبت به تیمار شاهد (آب مقطر) به ترتیب ۶۸/۴ درصد و ۱۱۶ درصد افزایش نشان داد. در مورد دو خصوصیت دیگر نیز همین روند افزایشی مشاهده شد. اما تیمار ۱/۲- مگاپاسکال تاثیر منفی شدیدی بر تمام خصوصیات مورد مطالعه نشان داد، به طوری که میزان رشد ساقه‌چه، ریشه‌چه و وزن تر گیاهچه، به ترتیب ۷۵/۸ درصد، ۶۲/۹ درصد و ۲۵/۸ درصد کاهش نشان دادند. با توجه به این نتایج، بهترین تیمار برای غربال لاین‌های موتانت متحمل به شوری، فشار اسمزی ۱/۲- مگاپاسکال تعیین شد (شکل۱).



شکل۱- روند رشد ریشه‌چه، ساقه‌چه و وزن تر گیاهچه رقم مادری ندا در پتانسیل‌های مختلف NaCl. طول ساقه‌چه (Sleng)، طول ریشه‌چه (Rleng) و وزن تر گیاهچه (SW) با علائم و رنگ‌های مختلف نشان داده شده‌اند.

دویست و دوازده لاین موتانت M_2 تحت تیمار NaCl در فشار اسمزی ۱/۲- مگاپاسکال قرار گرفتند و سه خصوصیت فوق در آنها با تیمار شاهد (رقم ندا) مقایسه شد. از بین آنها، تنها ۱۳۹ لاین موفق به تولید هر دو بخش (ریشه‌چه و ساقه‌چه) شدند. بنابراین، وزن تر کل گیاهچه تنها در این ۱۳۹ لاین اندازه‌گیری شد. آزمون t برای این سه صفت نشان داد که از نظر دو صفت طول ساقه‌چه و وزن تر گیاهچه تفاوت معنی‌داری میان ژنوتیپ‌ها وجود داشت (جدول۳).

بر اساس تجزیه خوشه‌ای با روش وارد، ژنوتیپ‌ها در چهار گروه اصلی حساس، نسبتا حساس، نسبتا متحمل و متحمل به شوری قرار گرفتند (جدول۴). ۱۸ لاین موتانت در گروه حساس، ۴۱ لاین موتانت به همراه رقم مادری ندا در گروه نسبتا حساس، ۶۵ لاین موتانت در گروه نسبتا متحمل و ۱۵ لاین موتانت در گروه متحمل قرار گرفتند.

تجزیه واریانس برای این گروه‌بندی نشان داد که تفاوت بسیار معنی‌داری میان گروه‌های به دست آمده با تجزیه خوشه‌ای وجود داشت (جدول ۵). مقایسه میانگین‌ها نشان داد که تفاوت چهار گروه برای هر سه صفت مورد مطالعه معنی‌دار می‌باشد (جدول ۴).

در نهایت، از میان ۱۵ لاین موتانت واقع در گروه متحمل، ۹ لاین با بیشترین سطح تحمل شوری انتخاب شدند (جدول ۶) تا به همراه رقم مادری در شرایط شوری خاک مورد ارزیابی مزرعه‌ای نیز قرار گیرند.

لاین‌های فوق به همراه شاهد (رقم مادری ندا) خزانه‌گیری و سپس به زمین اصلی منتقل شدند. پس از استقرار در مزرعه، تیمار شوری در دو سطح (شوری ۷ دسی زیمنس و خاک طبیعی مزرعه حدود ۱/۵ دسی زیمنس) تا زمان رسیدن کامل اعمال شد. تجزیه واریانس بر روی صفات مختلف نشان داد که از نظر بیشتر صفات مورد مطالعه تفاوت معنی‌داری هم بین تیمارهای شوری و هم بین ژنوتیپ‌ها وجود داشت (جدول ۷)؛ در حالی که اثر متقابل شوری × ژنوتیپ فقط برای وزن صد دانه، درصد باروری و درصد عقیمی خوشه معنی‌دار شد.

شوری تأثیر منفی بسیار معنی‌داری بر همه صفات مورد مطالعه به استثنای تعداد پنجه در بوته داشت. بیشترین افت ناشی از شوری به ترتیب مربوط به عملکرد دانه در بوته (۶۰/۵۲- درصد)، تعداد دانه پر در خوشه (۵۰/۹۵- درصد) و تعداد دانه کل در خوشه (۳۱/۴۵- درصد) بود، در حالی که صفات زمان خوشه‌دهی، تعداد پنجه در بوته و ارتفاع بوته کمترین افت را در شرایط شوری خاک نشان دادند (جدول ۸).

Archive of SID
www.SID.ir

جدول ۲- تجزیه واریانس اثر NaCl بر خصوصیات رشدی گیاهچه‌های رقم مادری ندا

منبع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات		
		طول ساقه‌چه	طول ریشه‌چه	وزن تر گیاهچه
تیمار NaCl	۴	۲۴/۳۸**	۲۳۵/۴۰۸**	۱/۴۰۶**
خطا	۱۲	۰/۱۶۹	۰/۲۷۶	۱/۲۷۱

جدول ۳- آزمون t برای سه صفت گیاهچه‌ای در ۱۳۹ لاین موتانت تحت تنش شوری NaCl (فشار اسمزی ۱/۲- مگاپاسکال)

صفت	آماره t	تفاوت میانگین موتانت‌ها با شاهد	انحراف معیار	کمینه	بیشینه	شاهد (ندا)
طول ساقه‌چه (mm)	۱۷/۹۱**	۳/۶۳	۲/۴۰	۱/۶	۱۴/۶	۳/۷
طول ریشه‌چه (mm)	۰/۵۲$^{n.s}$	۰/۲۸	۶/۴۸	۵/۱	۳۱/۳	۱۶/۸
وزن تر گیاهچه (mg)	۸/۴۲**	۲۷/۹۸	۳۹/۳۷	۳۴۵	۶۶۴	۴۲۰/۵

جدول ۴- گروه‌بندی ژنوتیپ‌های مورد مطالعه در شرایط تنش NaCl و مقایسه میانگین آنها

	خطای استاندارد (S.E.)	گروه ۱ (حساس)	گروه ۲ (نسبتا حساس)	گروه ۳ (نسبتا متحمل)	گروه ۴ (متحمل)
تعداد لاین‌ها	–	۱۸ لاین موتانت	۴۱ لاین موتانت + رقم مادری	۶۵ لاین موتانت	۱۵ لاین موتانت
میانگین طول ساقه‌چه (mm)	۰/۱۷۴	۴/۳۷^{d}	۶/۱۸^{c}	۸/۲۲^{b}	۱۰/۲۷^{a}
میانگین طول ریشه‌چه (mm)	۰/۳۹۳	۹/۵۳^{d}	۱۳/۳۳^{c}	۱۹/۱۴^{b}	۲۸/۲۲^{a}
میانگین وزن تر گیاهچه (mg)	۲/۵۱۲	۳۹۴/۳۳^{d}	۴۲۸/۱۱^{c}	۴۶۴/۱۵^{b}	۵۰۲/۶۰^{a}

جدول ۵- تجزیه واریانس گروه‌بندی حاصل از تجزیه خوشه‌ای برای سه صفت گیاهچه‌ای در لاین‌های موتانت به همراه رقم شاهد

منبع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات		
		طول ساقه‌چه	طول ریشه‌چه	وزن تر گیاهچه
گروه‌ها	۳	۱۹۸۰/۶۱**	۱۱۲۱۵/۷۷**	۷۰۷۲۲۹۵/۳۶**
خطا	۱۳۶	۲/۹۸	۱۵/۳۱	۶۲۵/۴۴

جدول ۶- میانگین سه خصوصیت گیاهچه‌ای در ۹ لاین موتانت انتخابی برای تحمل به شوری

	ندا	MT12	MT41	MT45	MT79	MT113	MT122	MT184	MT189	MT196
طول ساقه‌چه (mm)	۳/۷	۱۱/۶	۶/۸	۱۱/۵	۱۵/۸	۱۰/۳	۱۰/۴	۱۰/۳	۱۰/۴	۱۰/۲
طول ریشه‌چه (mm)	۱۶/۸	۲۴/۰	۲۹/۰	۳۱/۵	۴۴/۱	۳۰/۷	۳۱/۲	۲۸/۴	۳۳/۳	۳۶/۰
وزن تر گیاهچه (mg)	۴۲۰/۵	۵۲۲	۴۳۵	۴۹۹	۵۱۵	۵۱۲	۴۶۳	۴۸۶	۴۲۳	۴۹۱

جدول ۷- تجزیه واریانس اثر تیمار شوری، ژنوتیپ و اثر متقابل آنها بر صفات مورد مطالعه

منبع تغییرات	عملکرد	ارتفاع بوته	تعداد پنجه	زمان خوشه دهی	وزن صد دانه	بیوماس
تکرار	۸۶/۲۳۳$^{n.s}$	۹۳/۱۳۲**	۱۳/۵۳۱ $^{n.s}$	۱۴/۰۲۲*	۰/۰۳۵**	۲۹۴۵/۶۴۱**
شوری	۱۱۶۰۳/۰۴۶**	۵۸۰۵/۸۸۰**	۳/۲۹۸$^{n.s}$	۴۲/۴۵۷**	۶/۹۵۶**	۸۷۰۵/۸۸۲**
ژنوتیپ	۲۸۹/۲۵۱**	۱۹۲/۸۴۷**	۳۵/۱۶۴$^{n.s}$	۹۷/۴۲۲**	۰/۲۹۲**	۱۱۵۲/۸۷۷$^{n.s}$
شوری×ژنوتیپ	۱۲۰/۱۷۴$^{n.s}$	۲۳/۹۵۸$^{n.s}$	۲۷/۰۲۳$^{n.s}$	۶/۸۱۶$^{n.s}$	۰/۰۱۸*	۱۴۱۴/۹۶۶$^{n.s}$
خطا	۶۶/۴۲۹	۱۳/۰۵۸	۱۸/۸۲۴	۵/۲۶۲	۰/۰۰۹	۷۷۳/۸۷۳

Archive of SID
www.SID.ir

ادامه جدول ۷

منبع تغییرات	طول خوشه	تعداد کل دانه	تعداد دانه پر	درصد باروری	درصد عقیمی
تکرار	۳/۲۸۵**	۲۶۶/۲۳۸$^{n.s}$	۷۲۶/۳۷۷*	۷۵۲/۸۴۳**	۷۵۲/۸۴۳**
شوری	۴۵۰/۸۷۱**	۳۰۲۲۸/۴۸۰**	۵۱۹۶۶/۲۱۷**	۱۷۲۰۵/۲۲۹**	۱۷۲۰۵/۲۲۹**
ژنوتیپ	۱/۴۹۰$^{n.s}$	۴۰۹۳/۰۹۰**	۱۳۱۳/۷۵۳**	۱۰۱۸/۷۷۷**	۱۰۱۸/۷۷۷**
شوری×ژنوتیپ	۱/۵۹۴$^{n.s}$	۵۶۷/۷۵۶*	۴۹۵/۱۸۵$^{n.s}$	۶۶۳/۸۶۲**	۶۶۳/۸۶۲**
خطا	۰/۹۷۹	۲۸۳/۸۷۰	۲۹۲/۹۳۷	۱۶۵/۰۵۷	۱۶۵/۰۵۷

جدول ۸- مقایسه اثر خاک شور بر صفات مختلف در ۹ لاین موتانت انتخابی

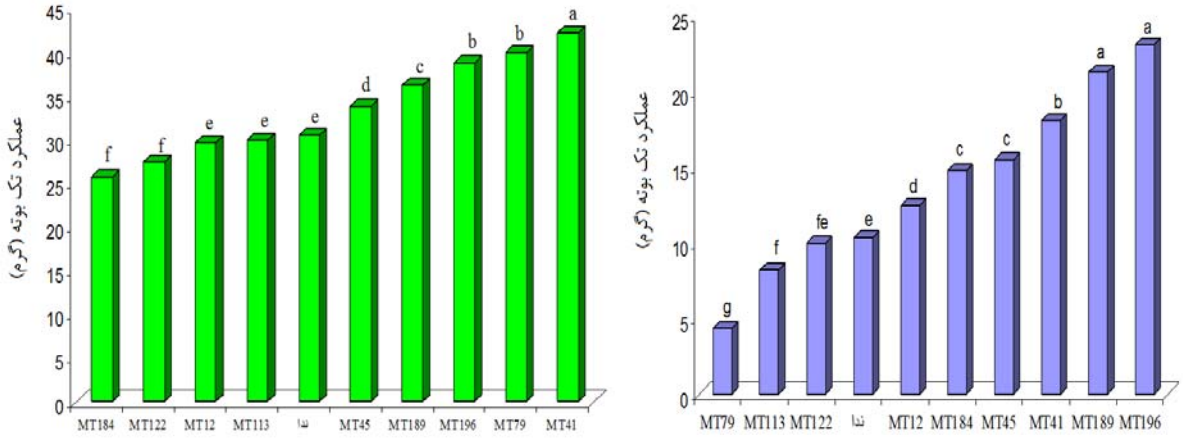
صفت	سطح شوری	میانگین	انحراف معیار استاندارد	اختلاف	درصد تغییر در محیط شور
عملکرد (گرم)	شاهد	۳۳/۱۱	۰/۹۹۴	-۲۰/۰۴**	
	تیمار	۱۳/۰۷	۱/۱۷۹		-۶۰/۵۲
ارتفاع بوته (سانتی‌متر)	شاهد	۸۷/۶۳	۰/۴۴۱	-۱۴/۱۸**	
	تیمار	۷۳/۴۵	۰/۵۲۳		-۱۶/۱۷
تعداد پنجه	شاهد	۱۵/۵۸	۰/۵۲۹	-۰/۳۴$^{n.s}$	
	تیمار	۱۵/۲۴	۰/۶۲۷		-۲/۱۶
زمان خوشه دهی (روز)	شاهد	۹۸/۹۹	۰/۲۸	۱/۱۹**	
	تیمار	۱۰۰/۱۸	۰/۳۳۲		۱/۲۲
وزن صد دانه (گرم)	شاهد	۲/۷۹	۰/۰۱۱	-۰/۴۹**	
	تیمار	۲/۳۰	۰/۰۱۴		-۱۷/۵۴
بیوماس (گرم)	شاهد	۱۲۵/۵۴	۳/۳۹۴	-۱۷/۳۵**	
	تیمار	۱۰۸/۱۹	۴/۰۲۳		-۱۳/۸۲
طول خوشه (سانتی‌متر)	شاهد	۲۳/۳۸	۰/۱۲۱	-۳/۹۵**	
	تیمار	۱۹/۴۳	۰/۱۴۳		-۱۶/۸۹
تعداد کل دانه	شاهد	۱۰۲/۸۳	۲/۰۵۵	-۳۲/۳۴**	
	تیمار	۷۰/۴۹	۲/۴۳۶		-۳۱/۴۵
تعداد دانه پر	شاهد	۸۳/۲۱	۲/۰۸۸	-۴۲/۴۰**	
	تیمار	۴۰/۸۱	۲/۴۷۵		-۵۰/۹۵
درصد باروری خوشه	شاهد	۸۱/۹۹	۱/۵۶۷	-۲۴/۴۰**	
	تیمار	۵۷/۵۹	۱/۸۵۸		-۲۹/۷۵

مقایسه میانگین‌ها نشان داد که در شرایط شوری شش لاین موتانت عملکرد بالاتری نسبت به رقم مادری داشتند، اما در بین آنها سه لاین موتانت MT196، MT189 و MT41 نسبت به رقم مادری عملکرد بالاتری تولید کردند (شکل۲). با توجه به میزان شاخص تحمل تنش (STI)، سه لاین موتانت MT196، MT189 و MT41 به ترتیب دارای بالاترین سطح تحمل به تنش شوری بودند (جدول۹).

محاسبه افت عملکرد ناشی از تنش شوری (جدول ۱۰) نشان داد که لاین MT79 بیشترین افت عملکرد (۸۹ درصد) را دارا بود در حالیکه دو لاین MT189 و MT196، به ترتیب با ۴۰/۵ و ۴۱/۲ درصد افت، حساسیت کمی به تنش شوری نشان دادند.

برای بررسی سطح تنوع مولکولی حاصل از تیمار جهش در ۹ لاین موتانت متحمل به شوری، از ۵۴ نشانگر ISSR استفاده شد که ۲۷ نشانگر (۵۰ درصد) چندشکلی میان رقم مادری و لاین‌های موتانت را آشکار ساختند. شکل ۳ نمونه‌ای از الگوی باندهی یکی از آغازگرهای ISSR را نشان می‌دهد.

Archive of SID
www.SID.ir



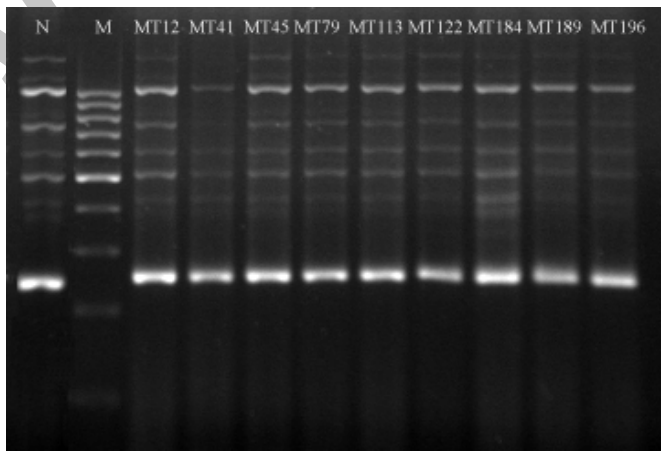
شکل ۲- مقایسه میانگین عملکرد تک بوته بین رقم شاهد و لاین‌های موتانت انتخابی در شرایط بدون تنش شوری (راست) و تنش شوری خاک (چپ)

جدول ۹- عملکرد تک بوته در شرایط بدون تنش و تنش و شاخص تحمل به تنش در رقم مادری و لاین‌های موتانت انتخابی

	ندا	MT12	MT41	MT45	MT79	MT113	MT122	MT184	MT189	MT196
عملکرد تک بوته در شرایط بدون تنش (گرم)	۳۰/۵	۲۹/۶	۴۲/۲	۳۳/۸	۳۹/۹	۲۹/۹	۲۷/۴	۲۵/۷	۳۶/۲	۳۸/۸
عملکرد تک بوته در شرایط تنش (گرم)	۱۰/۴	۱۲/۵	۱۸/۱	۱۵/۵	۴/۴	۸/۲	۱۰/۰	۱۴/۸	۲۱/۳	۲۳/۱
شاخص تحمل تنش (STI) در مرحله گیاه کامل (٪)	۲۷/۶	۳۲/۲	۶۶/۲	۴۵/۶	۱۵/۴	۲۱/۳	۲۳/۷	۳۳/۰	۶۶/۷	۷۷/۹

جدول ۱۰- مقایسه افت عملکرد ناشی از تنش در رقم مادری و ۹ لاین موتانت انتخابی

ژنوتیپ	ندا	MT12	MT41	MT45	MT79	MT113	MT122	MT184	MT189	MT196
افت عملکرد										
بر حسب گرم	۲۰/۱	۱۷/۱	۲۴/۱	۱۸/۳	۳۵/۵	۲۱/۷	۱۷/۴	۱۰/۹	۱۴/۹	۱۵/۷
بر حسب درصد	۶۵/۹	۵۷/۸	۵۷/۱	۵۴/۱	۸۹/۰	۷۲/۶	۶۳/۵	۴۲/۴	۴۱/۲	۴۰/۵



شکل ۳- الگوی باندهی لاین‌های موتانت و رقم شاهد با آغازگر ISSR6. N) رقم شاهد (ندا)؛ MT12 تا MT196) لاین‌های موتانت انتخابی؛ M) نشانگر اندازه مولکولی ۱۰۰ bp.

Archive of SID
www.SID.ir

شاخص تنوع ژنتیکی نئی ۱۲/۹ درصد و شاخص تنوع شانون ۲۱ درصد محاسبه شد. تجزیه خوشه‌ای با روش UPGMA لاین‌ها را به دو گروه عمده تفکیک نمود که در گروه اول رقم مادری ندا و لاین موتانت MT79 و در گروه دوم ۸ لاین موتانت دیگر قرار گرفتند (شکل ۴).

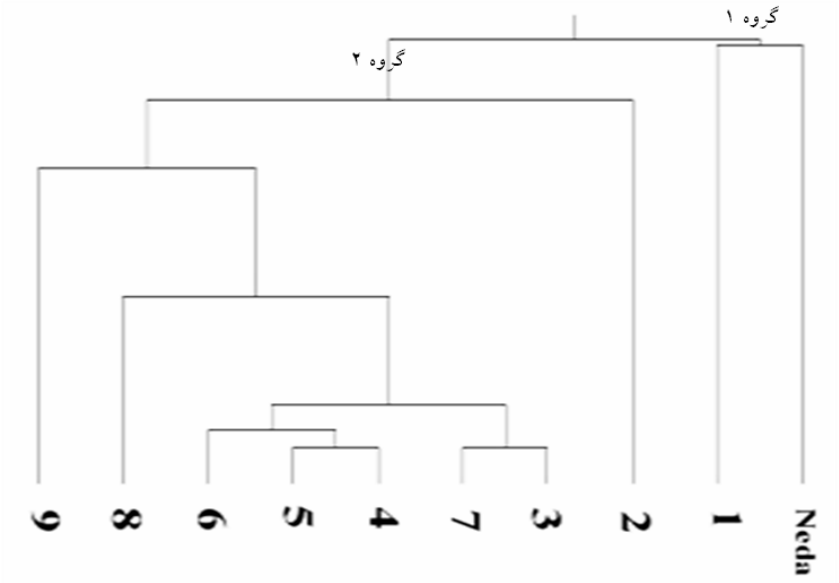
میانگین عملکرد در شرایط بدون تنش و تنش برای گروه یک به ترتیب ۳۵/۲ و ۷/۴ گرم در بوته و برای گروه دوم به ترتیب ۳۲/۹ و ۱۵/۴ گرم در بوته محاسبه شد. میانگین شاخص تحمل به تنش (STI) برای گروه یک ۲۱/۵ درصد و برای گروه دوم ۴۵/۸ درصد به دست آمد (جدول ۱۱). این نتایج نشان دهنده تاثیر مطلوب جهش برای ایجاد لاین‌های موتانت متحمل به شوری در برنج می‌باشد.

استفاده از جهش‌های القایی در ۵۰ سال گذشته، نقش مهمی در توسعه واریته‌های گیاهی برتر داشته است. هزاران موتانت مفید برای خصوصیات مختلف در بسیاری از گیاهان زراعی به وسیله موتاژن‌های فیزیکی و شیمیایی ایجاد شده‌اند (Ram Din et al. 2003; Morton et al. 2006; Okamura et al. 2012) و از این ابزار به منظور بهبود بسیاری از خصوصیات مهم زراعی از قبیل دوره رشد کوتاه‌تر، تناسب برای تناوب، افزایش تحمل یا مقاومت به تنش‌های زنده و غیر زنده در گیاهان مهم زراعی مانند گندم، برنج، جو، پنبه، بادام زمینی، و سویا استفاده شده است (Ahloowalia and Maluszinski 2001; Bhatia et al. 2001; Cheema et al. 2002). انتخاب مواد اصلاحی، مهمترین مرحله در برنامه‌های اصلاح با استفاده از جهش می‌باشد. بهترین واریته تجاری سازگار، به عنوان ماده اصلاحی اولیه انتخاب می‌شود. این واریته باید تمام خصوصیات مطلوب اقتصادی را دارا باشد و با استفاده از مواد جهش‌زا تنها یک یا دو خصوصیت آن بایستی، تغییر داده شود (Van Harten 1998; Bodnar and Scott 2010). در تحقیق حاضر نیز رقم تجاری الیت ندا که از ارقام اصلاح شده سازگار، پرعملکرد و نیمه پاکوتاه منطقه شمال کشور می‌باشد جهت بهبود برخی خصوصیات نامطلوب از طریق جهش‌زایی با موتاژن EMS انتخاب شد. این رقم از نظر تحمل به تنش‌های غیر زنده مانند شوری در وضع مطلوبی قرار ندارد؛ چنانچه نتایج این تحقیق نیز نشان داد این رقم در مرحله گیاهچه‌ای در گروه ژنوتیپ‌های نسبتا حساس قرار گرفت (جدول ۴) و در مرحله گیاه کامل نیز با توجه به شاخص تحمل به تنش (جدول ۹) در وضعیت نامطلوبی قرار داشت. بنابراین، انتخاب روش اصلاح به کمک جهش برای بهبود تحمل به تنش شوری در این رقم گزینه‌ای کم هزینه و نسبتا سریع بود. این نتیجه‌گیری با اظهارات (Ahloowalia et al. 2004; Ilirjana et al. 2007; Khan and Goyal 2009) مبنی بر کارآمدی، سرعت و کم هزینه بودن اصلاح به کمک جهش، تطابق دارد. تاکنون بیش از ۲۵۰۰ واریته گیاهی حاصل از جهش القایی جهت کشت تجاری آزاد شده‌اند که یا مستقیما به عنوان واریته جدید و یا به عنوان والدین برای ایجاد واریته‌های جدید استفاده می‌شوند (Ojiewo et al. 2007).

از ماده شیمیایی EMS به طور گسترده در آزمایش‌های متعددی برای تولید موجودات جهش‌یافته اعم از گیاه و میکروارگانیسم استفاده شده است. تاثیر این ماده شیمیایی تابع شرایط و عواملی مانند غلظت، مدت زمان تیمار، درجه حرارت محیط، نسبت مقدار بذر به حجم محلول EMS و ... می‌باشد. انتخاب غلظت مناسب EMS که اصلی‌ترین عامل در بین عوامل مختلف است، باید به نحوی باشد که رابطه قطعی و قابل قبولی با صفات مورد ارزیابی در گیاهان جهش‌یافته داشته باشد (Rakshit et al. 2010). نتایج دوز سنجی ماده EMS در این تحقیق نشان داد که دوز ۰/۱ درصد بیشترین کارایی را برای هدف‌گیری ژنوم بذر برنج دارا بود که این یافته با نتایج برخی مطالعات مبنی بر جهش‌زایی مطلوب با دوزهای پایین EMS در گیاهان تطابق دارد (Luan et al. 2007; Giri et al. 2010; Benjavad Talebi et al. 2012). البته، در برخی مطالعات مانند (Lee et al. 2003) EMS در غلظت نزدیک به ۱- ۰/۵ درصد بالاترین کارایی را در ایجاد جهش دارا بود.

از غربال ۲۱۲ لاین موتانت حاصل از جهش‌زایی رقم الیت ندا با موتاژن EMS، در مرحله گیاهچه‌ای تعدادی لاین موتانت بر اساس خصوصیات رشدی گیاهچه در شرایط تنش شوری به عنوان لاین‌های با پتانسیل تحمل به شوری انتخاب شدند. ولی از آنجا که ممکن است بین تحمل به تنش در مراحل ابتدایی رشد گیاه و تحمل به تنش در مرحله گیاه بالغ ارتباطی نباشد

Archive of SID
www.SID.ir



شکل ۴- گروه‌بندی لاین‌های موتانت انتخابی متحمل به شوری به همراه رقم مادری ندا با روش UPGMA بر اساس نشانگرهای ISSR. شماره‌های ۱ تا ۹ به ترتیب عبارتند از: MT79، MT45، MT122، MT113، MT12، MT189، MT184، MT196 و MT41.

جدول ۱۱- مقایسه عملکرد و شاخص تحمل به تنش (STI) در دو گروه شناسایی شده با تجزیه خوشه‌ای در شرایط بدون تنش و تنش

گروه	شرایط بدون تنش (گرم)	شرایط تنش (گرم)	متوسط عملکرد (گرم)	STI (%)
۱	۳۵/۲	۷/۴	۲۱/۳	۲۱/۵
۲	۳۲/۹	۱۵/۴	۲۴/۲	۴۵/۸

(Ahmadikhah 2010)، ارزیابی‌ها در مرحله گیاه بالغ (از اوایل پنجه‌زنی تا انتهای فصل رشد) نیز ادامه پیدا کرد. ارزیابی ۹ لاین برتر در شرایط شوری خاک نشان داد که سه لاین MT41، MT189 و MT196 نسبت به رقم مادری عملکرد بالاتری تولید کردند (شکل۲). بررسی شاخص تحمل به تنش (STI) موید تحمل بالاتر سه لاین فوق به تنش شوری بود (جدول۹). اما، محاسبه افت عملکرد ناشی از تنش (جدول۱۰) نشان داد که علاوه بر دو لاین MT189 و MT196، لاین MT184 نیز در مرحله گیاه بالغ حساسیت کمی به تنش شوری نشان داد. از اینرو می‌توان دو لاین موتانت MT189 و MT196 را به عنوان لاین‌های متحمل به شوری در هر دو مرحله گیاهچه‌ای و گیاه کامل (با شوری ۶ دسی زیمنس بر متر) معرفی نمود. چهار واریته امیدبخش جاسمین مصری حاصل از جهش‌زایی فیزیکی در شرایط شوری خاک محصول بالاتری نسبت به واریته‌های مادری خود تولید کردند (Shehata et al. 2009). نتیجه این تحقیق و سایر تحقیقات بیانگر پتانسیل اصلاح به کمک جهش برای ایجاد واریته‌های جدید با خصوصیات مطلوب زراعی می‌باشد (Jana and Roy 1973; Lee et al. 2003; Saleem et al. 2005; Anbarasan et al. 2013; Muthusamy and Jayabalan 2013).

نتایج همچنین نشان داد که شوری تاثیر منفی بسیار معنی‌داری بر همه صفات مورد مطالعه (به استثنای تعداد پنجه در بوته) داشت. بیشترین افت ناشی از شوری به ترتیب مربوط به عملکرد دانه در بوته (بیش از ۶۰ درصد)، تعداد دانه پر و تعداد دانه کل در خوشه بود، در حالی که صفات فنولوژیک مانند زمان خوشه‌دهی، تعداد پنجه در بوته و ارتفاع بوته کمترین افت را در شرایط شوری خاک نشان دادند (جدول۸).

Archive of SID
www.SID.ir

بررسی تغییرات مولکولی لاین‌های موتانت انتخابی با نشانگرهای ISSR نشان داد که تیمار جهش توانست چندشکلی نسبتا بالایی (۵۰ درصد) در آنها ایجاد کند. این سطح از چندشکلی قابل مقایسه با تغییرات انباشته شده در طی روند تکامل ارقام امروزی می‌باشد. تنوع ژنتیکی موجود در نمونه‌های مورد مطالعه معادل ۱۲/۹ درصد محاسبه شد که موید تاثیر تیمار جهش‌زا در جهت ایجاد تغییرات کافی در سطح DNA می‌باشد. این نتایج نشان دهنده قدرت و کارایی جهش با موتاژن EMS در ایجاد تنوع ژنتیکی می‌باشد که دست به‌نژادگر را برای اعمال انتخاب در جهت بهبود واریته‌های گیاهی با خصوصیات مطلوب باز می‌گذارد. در مطالعه Wongswad et al. (2005) به منظور بررسی تنوع ژنتیکی لاین‌های موتانت از ده آغازگر RAPD استفاده شد که تنها یک آغازگر (OPX13) اختلاف بین ارقام جهش‌یافته و وحشی را نشان داد. همچنین در مطالعه تنوع طبیعی نمونه‌های مختلف گیاه *Jatropha curcas* که از ۵۰ آغازگر ISSR استفاده شده بود، تنها ۵ آغازگر (۱۰ درصد) توانستند تفاوت میان اکوتیپ‌ها را آشکار نمایند (Maghuly et al. 2011). در تحقیق حاضر، لاین‌های انتخابی بر اساس امتیاز نشانگرهای ISSR در دو گروه (گروه ۱ شامل رقم مادری و MT79 و گروه ۲ شامل ۸ لاین موتانت دیگر) قرار گرفتند که گروه ۲ نسبت به گروه ۱ هم دارای عملکرد و هم شاخص تحمل به تنش دو برابری بود (جدول ۱۱). این نشان می‌دهد که نشانگرهای ISSR به خوبی توانستند لاین‌های متحمل را از رقم مادری نسبتا حساس تفکیک نمایند. از اینرو می‌توان نشانگرهای ISSR را برای جداسازی لاین‌های موتانت متحمل در جمعیت‌های موتانت برنج به کار برد. بر اساس این تحقیق، می‌توان دو لاین MT189 و MT196 را به عنوان لاین‌های متحمل به شوری در هر دو مرحله گیاهچه‌ای و گیاه بالغ معرفی کرد.

منابع

Ahloowalia BS, Maluszynski M, Nichterlein K (2004) Global impact of mutation-derived varities. Euphytica 135: 187-204.

Ahmadikhah A (2008) Advanced Genetics. Publication of Gorgan University of Agricultural Sciences & Natural Resources. Gorgan, Iran. pp 239-265. (In Farsi).

Ahmadikhah A (2009) A rapid mini-prep DNA extraction method in rice. African Journal of Biotechnology 8: 323-27.

Ahmadikhah A (2010) Advanced Plant Breeding. Publication of Gorgan University of Agricultural Sciences & Natural Resources. Gorgan, Iran. pp 161-210. (In Farsi).

Anbarasan K, Sivalingam D, Rajendran R, Anbazhagan M,Chidambaram AA (2013) Studies on the mutagenic effect of EMS on seed germination and seedling characters of Sesame (*Sesamum indicum* L.) Var. T MV3. International Journal of Research in Biological Sciences 3: 68-70.

Anderson JA, Churchill JE, Autrique SD, Tanksley S, Sorrells ME (1993) Optimizing parental selection for genetic linkage maps. Genome 36: 181-188.

Baloch AW, Soomro AM, Javed MA, Bughio HR, Alam M, Bughio MSH, Mastori TM, Mastori, NN (2003) Induction of salt tolerance in rice through mutation breeding. Asian Journal of Plant Sciences 2: 273-276.

Benjavad Talebi A, Benjavad Talebi A, Shahrokhifar B (2012) Ethyl methane sulphonate (EMS) induced mutagenesis in Malaysian rice (cv. MR219) for lethal dose determination. American Journal of Plant Sciences 3: 1661-1665.

Bhatia CR, Nichterlein K, Maluszynski M (2001) Mutations affecting nodulation in grain legumes and their potential in sustainable cropping systems. Euphytica 120: 415-432.

Blair MW, Panaud O, McCouch SR (1999) Inter-simple sequence repeat (ISSR) amplification for analysis of microsatellite motif frequency and fingerprinting in rice (*Oryza sativa* L). Theoretical and Applied Genetics 98: 780-792.

Bodnar AL, Scott MP (2010) Using mutations in corn breeding programs. In: Meksem K, Kahl G (eds). The Handbook of Plant Mutation Screening. Wiley-VCH. Germany. pp 187-197.

Bughio HR, Asad MA, Odhano IA, Bughio MS, Khan MA, Mastoi NN (2007) Sustainable rice production through the use of mutation breeding. Pakistan Journal of Botany 39: 2457-2461.

Cheema AA, Saleem MY, Awan MA (2002) In vitro techniques for the selection of Basmati rice mutants better adapted to saline environments. In: Maluszynski M, Kasha KJ (eds). Mutation, in vitro and Molecular Techniques for Environmentally Sustainable Crop Improvement. IAEA, Vienna. pp 161-168.

de la Torre MP, Heinz MGR, Escandón A (2012) Analysis of genetic variability by ISSR markers in *Calibrachoa caesia*. Electronic Journal of Biotechnology 15: 1-12.

Archive of SID

www.SID.ir

Fernandez GCJ (1992) Effective selection criteria for assessing stress tolerance. In: Kuo CG (ed.), Proceedings of the International Symposium on Adaptation of Vegetables and Other Food Crops in Temperature and Water Stress, Tainan, Taiwan.
Giri SP, Tambe AB, Apparao BJ (2010) Induction of a novel, high yielding mutant of pigeon pea. Asian Journal of Experimental Biological Sciences 1: 152-155.
Hase Y, Akita Y, Kitamura S, Narumi I, Tanaka A (2012) Development of an efficient mutagenesis technique using ion beams: Toward more controlled mutation breeding. Plant Biotechnology 29: 193-200.
Hase Y, Okamura M, Takeshita D, Narumi I, Tanaka A (2010) Efficient induction of flower-color mutants by ion beam irradiation in petunia seedlings treated with high sucrose concentration. Plant Biotechnology 27: 99-103.
Ilirjana S, Ariana Y, Andon D (2007) Induced mutations for improving production on bread and durum wheat. AIP Conference Proceedings 899: 747.
Jabeen N, Mirza B (2002) Ethyl methane sulfonate (EMS) enhaces genetic variability in *Capsicum annum.* Asian Journal of Plant Sciences 1: 425-428.
Jana MK, Roy K (1973) Induced quantitative mutations in rice. Radiation Botany 13: 245-257.
Khademian R, Babaeian Jelodar N, Kianoosh Gh (2004) Study of gamma radiation mutagenesis effects on some Iranian rice cultivars. Researches on Agricultural Sciences and Natural Resources of Khazar 2: 16-26. (In Farsi)
Khan S, Goyal S (2009) Mutation genetic studies in mungbean IV. Selection of early maturing mutants. Thailand Journal of Agricultural Science 42: 109-113.
Kinnear PR, Colin DG (2000) SPSS for Windows made simple: Release 10. Hove, UK: Psychology Press.
Kunz W, Henle J, Ninham BW (2004) About the science of the effect of salts. Current Opinion in Colloid Interface Science 9: 19-37.
Lee SY, Cheong JI, Kim TS (2003) Production of doubled haploids through anther culture of M_1 rice plants derived from mutagenized fertilized egg cells. Plant Cell Report 22: 218-223.
Liu BM, Wu YJ, JP Tong, Wu JD (2010) A novel semi-dwarf mutant mutagenized with ion beam irradiation controlled by a dominant gene, SD-d(t). Rice Genetic Newsletter 25: 20-22.
Luan YS, Zhang J, Gao X, An LJ (2007) Mutation induced by ethyl methane sulphonate (EMS), *in vitro* screening for salt tolerance and plant regeneration of sweet potato (*Ipomoea batatas* L.). Plant Cell and Tissue Organ Culture 88: 77-81.
Maghuly F, Jankowicz-Cieslak J, Calari C, Ramkat R, Till B, Laimer M (2011) Investigation of genetic variation in *Jatropha curcas* by Ecotilling and ISSR. BMC Proceedings 5 (Suppl 7): O50.
Mba C (2013) Induced mutations unleash the potentials of plant genetic resources for food and agriculture. Agronomy 3: 200-231.
Meloni DA, Gulotta MR, Martínez CA, Oliva MA (2004) The effects of salt stress on growth, nitrate reduction and proline and glycinebetaine accumulation in *Prosopis alba.* Brazilian Journal of Plant Physiology 16: 39-46.
Micke A (1999) Mutation and in vitro mutation breeding. Bahar Samiullah Khan A, Kalani Publishers, Ludhiana, India. pp 1-19.
Monna L, Kitazawa N, Yoshino R, Suzuki J, Masuda H, Maehara Y, Tanji M, Sato M, Nasu S, Minobe Y (2002) Positional cloning of rice semidwarfing gene, *sd*-1: rice "green revolution gene" encodes a mutant enzyme involved in gibberellin synthesis. DNA Research 9: 11-17.
Morton BR, Bi IV, McMullen MD, Gaut BS (2006) Variation in mutation dynamics across the maize genome as a function of regional and flanking base composition. Genetics 172: 569-577.
Muthusamy A, Jayabalan N (2013) Variation in seed protein content of cotton mutant lines by *in vivo* and *in vitro* mutagenesis. Journal of Environmental Biology 34: 11-16.
Naderi Shahab MA, Mehrpor SH, Jebelly M, Jafari AA (2007) Mutagenesis effects of EMS and UV-C iradiation doses on *Medicago sativa* L. Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research 15: 183-195. (In Farsi)
Nei M (1978) Analysis of gene diversity in subdivided populations. Proceeding of National Academy of Science USA 70: 3321-3323.
Ojiewo CO, Murakami K, Masinde P W, Agong SG (2007) Mutating breeding of African nightshade (*Solanum section Solanum*). Fruit, vegetable and Cereal Science and Biotechnology 1: 39-52.
Okamura M, Umemoto N, Onishi N (2012) Breeding glittering carnations by an efficient mutagenesis system. Plant Biotechnology 29: 209-214.
Patnaik A, Chaudhary D, Rao GJN (2006) Genetic improvement of long grain aromatic rices through mutation approach. Plant Mutation 1: 7-10.
Rakshit S, Kanzaki H, Matsumura H, Rakshit A, Fujibe T, Okuyama Y, Yoshida K, Oli M, Shenton M, Utsushi H, Mitsuoka C, Abe A, Kiuchi Y, Terauchi R (2010) Use of TILLING for reverse and forward genetics of rice. In: Meksem K, Kahl G (eds). The Handbook of Plant Mutation Screening. Wiley-VCH. Germany. pp 187-197.
Ram Din M, Khan M, Qasim M, Jehan S, Iqbal Khan MM (2003) Induced mutation studies in three wheat (*Triticume aestivum* L.) varieties for some morphological and agronomical characters. Asian Journal of Plant Sciences 2: 1179-1182.
Saleem MY, Mukhtar Z, Cheema AA, Atta BM (2005) Induced mutation and in vitro techniques as a method to induce salt tolerance in Basmati rice (*Oryza sativa* L.). International Journal of Environmental Science Technology 2: 41-145.
Sayed OEE, Rizkalla AA, Sabri SRS (2007) *In vitro* Mutagenesis for genetic improvement of salinity tolerance in wheat. Journal of Agriculture and Biological Sciences. 4: 377-383.

Archive of SID
www.SID.ir

Shehata SM, Allah AA, Zayed BA (2009) Development of Salt Tolerant rice lines through mutation breeding. Journal of Agriculture Research 35: 954-963.
Shu QY, Lagoda PJL (2007) Mutation techniques for gene discovery and crop improvement. Molecular Plant Breeding 2: 193-195.
Van Harten AM (1998) Mutation Breeding: Theory and Practical Applications. Cambridge University Press, London, UK.
Wongsawad P, Wongsawad C, Mahadtanapuk S, Kantawong S, Chariyavidhawat P, Paratasilpin T (2005) Induced mutation in *adenium obesum* Balf. using ethyl methane sulphonate. Proceedings of Congress on Science and Technology of Thailand. Suranaree University of Technology. 31: 18-20.
Yeh FC, Yang R-C, Boyle TBJ, Ye Z-H, Mao JX (1997) POPGENE, the User-friendly shareware for population genetic analysis. Molecular Biology and Biotechnology Centre, University of Alberta, Canada.
Zietkiewicz E, Rafalski A, Labuda D (1994) Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. Genomics 20: 176-183.

Archive of SID

www.SID.ir