

پاسخ لاین‌های موتانت برنج به تنش شوری در مرحله گیاهچه‌ای با استفاده از صفات مورفولوژیک و نشانگرهای ریزماهواره

میرحسام‌الدین حسینی^۱، بابک ربیعی^{۲*}، علی‌اکبر عبادی^۳ و مجتبی کردرستمی^۴

تاریخ دریافت: ۹۶/۰۳/۲۸

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۶/۸

چکیده

تنش شوری بعد از خشکی، دومین مشکل عمده و عامل محدودکننده تولید برنج است. به منظور بررسی آثار تنش شوری بر برخی از ویژگی‌های مورفولوژیک و فیزیولوژیک برنج، تعداد ۴۱ لاین موتانت حاصل از پرتوتابی اشعه گاما به چهار رقم برنج (دو رقم محلی ایرانی هاشمی و طارم محلی و دو رقم اصلاح‌شده خزر و فجر) به همراه ارقام والدینی و دو لاین استاندارد FL478 (متحمل به شوری) و Teqqing (حساس به شوری) تحت سه شرایط شوری (شاهد، ۶ و ۱۲ دسی‌زیمنس بر متر) مورد بررسی قرار گرفتند. آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی با شش تکرار اجرا شد. علاوه بر آن، تنوع بین ژنوتیپ‌ها با دوازده نشانگر ریزماهواره پیوسته با QTL بزرگ‌اثر تحمل به شوری (SaltTol) بررسی شد. نتایج تجزیه واریانس، وجود تفاوت معنی‌دار و قابل توجه بین ژنوتیپ‌ها را برای همه صفات مورد مطالعه نشان داد. نتایج حاصل از تجزیه خوشه‌ای داده‌های مورفولوژیک، ضمن تفکیک ژنوتیپ‌ها به سه گروه، لاین‌های موتانت M1، M3، M7، M9، M35، M37، M40 را در کنار لاین شاهد متحمل به شوری FL478 و رقم‌های فجر و هاشمی و لاین‌های M47، M48، M49، M56 را در کنار لاین شاهد حساس به شوری Teqqing گروه‌بندی کرد. تجزیه خوشه‌ای داده‌های مولکولی نیز ژنوتیپ‌ها را در سه گروه اصلی قرار داد، به طوری که لاین‌های موتانت M37، M35، M40 به همراه لاین شاهد FL478 به عنوان ژنوتیپ‌های متحمل به شوری و لاین‌های موتانت M36، M47، M48، M49، M54 و M56 به همراه لاین شاهد Teqqing به عنوان ژنوتیپ‌های حساس به شوری گروه‌بندی شدند. آزمون منتل میزان تشابه این دو تجزیه خوشه‌ای را ۶۵ درصد نشان داد که دلیل این مشابهت زیاد، استفاده از نشانگرهای پیوسته با QTL بزرگ‌اثر تحمل به شوری SaltTol بود که هر یک از آن‌ها با چند صفت مطالعه شده در این تحقیق نیز پیوسته بودند. همان‌طور که ملاحظه می‌شود، هر سه لاین متحمل به شوری شناسایی شده در تجزیه داده‌های مولکولی، در تجزیه خوشه‌ای صفات مورفولوژیک نیز شناسایی و هر چهار لاین حساس به شوری شناسایی شده در تجزیه صفات مورفولوژیک، در تجزیه خوشه‌ای داده‌های مولکولی نیز شناسایی شدند. ارزیابی نشانگرهای ریزماهواره نیز نشان داد که نشانگرهای AP3206، RM5، RM3412 و RM140 آگاهی‌بخش‌ترین نشانگرها جهت بررسی تنوع ژنتیکی تحمل به شوری در این تحقیق بودند.

واژه‌های کلیدی: تحمل به شوری، حساسیت به شوری، SaltTol

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران

۲- استاد، گروه تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران

۳- استادیار پژوهش، موسسه تحقیقات برنج کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، رشت، ایران

۴- دانش‌آموخته دکتری، گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران

* نویسنده مسئول: rabiei@guilan.ac.ir

مقدمه

تنش‌های غیرزنده، عامل مهم کاهش ۷۱ درصدی محصولات زراعی در سطح جهان هستند که این مقدار برای تنش شوری ۲۰ درصد تخمین زده می‌شود (Kafi et al., 2007). بیش از ۸۰۰ میلیون هکتار از زمین‌های زراعی دنیا تحت تاثیر شوری قرار دارند (Munns, 2005). شوری به شرایطی از وضعیت خاک گفته می‌شود که غلظت نمک‌های محلول در آن چهار دسی‌زیمنس بر متر یا بیشتر باشد (Kafi et al., 2007). غلظت بالای نمک‌ها سبب عدم تعادل یونی و تنش اسمزی در گیاهان می‌شوند و معمولاً به دنبال آن، تنش‌های بعدی مانند خسارت اکسیداتیو نیز رخ می‌دهد (Zhu, 2001). تحمل به شوری در برنج در مراحل مختلف رشدی، از جمله جوانه‌زنی، رشد رویشی و مرحله زایشی متفاوت است (Ammar et al., 2007). گیاه برنج در مرحله جوانه‌زنی به شوری نسبتاً متحمل است (Flowers and Yeo, 1995). این گیاه در اوایل دوره گیاهچه‌ای (سه برگی) خیلی حساس، در مرحله رویشی مقاوم، در مرحله گرده‌افشانی و لقاح مجدداً حساس و در دوره رسیدن دانه به‌طور قابل‌توجهی مقاوم‌تر می‌شود (Fotookian et al., 2004).

تولید گیاهان مقاوم به تنش، مستلزم شناخت مسیرهای فیزیولوژیک و مولکولی مقاومت است و درک اساس ژنتیکی مکانیزم‌های مقاومت، به‌نژادگران را در روند تولید محصول بیشتر و با کیفیت‌تر و نیز حفظ پایداری صفات مطلوب در گیاهان یاری می‌رساند (Arzani, 2004). با این حال، اصلاح گیاهان زراعی و گسترش کاشت آن‌ها، تنوع که مهم‌ترین عامل بقای موجودات در شرایط متغیر محیطی است را به مرور زمان کاهش می‌دهد و بنابراین، موفقیت برنامه‌های اصلاحی نیز که بستگی مستقیم به وجود تنوع در جمعیت‌های مورد مطالعه دارد، کاهش می‌یابد. در این گونه موارد، به‌نژادگر باید به طریقی تنوع مورد نیاز برنامه اصلاحی خود را ایجاد کند. جهش که عبارت است از تغییرات ناگهانی در ساختار ژنتیکی یک موجود زنده، یکی از روش‌های ایجاد تنوع در مجموعه ژرم‌پلاسماها است.

اصلاح یک گیاه یا گزینش یک رقم برتر به‌منظور دستیابی به عملکرد بالا و پایدار تحت شرایط محیطی سخت و نامطلوب، نیازمند شناسایی ارقام مقاوم و حساس و تفکیک آن‌ها با روش‌های مناسب است. از جمله این

روش‌ها می‌توان به ارزیابی فنوتیپی یک گیاه در مراحل مختلف رشد تحت شرایط تنش و بدون تنش و بررسی شاخص‌های مقاومت یا حساسیت اشاره کرد (Fernandez, 1992; Gregorio et al., 1997). روش دیگری که امروزه بیشتر استفاده می‌شود، گزینش ارقام بر مبنای نشانگرهای مولکولی است. در واقع در صورت وجود همبستگی زیاد بین صفت مورد نظر و نشانگر مولکولی، می‌توان به جای گزینش صفت به گزینش بر اساس نشانگر اقدام کرد، زیرا گزینش بر اساس نشانگرهای مولکولی آسان‌تر و کم‌هزینه‌تر است، موجب صرفه‌جویی در زمان می‌شود و در عین حال تحت تاثیر محیط قرار نمی‌گیرد (Kordrostami et al., 2016). مونز و تستر (Munns and Tester, 2008) نشان دادند که حضور نمک در محیط اطراف ریشه، موجب کمبود آب و کاهش تورژسانس سلولی در گیاه شده و در نهایت باعث کاهش رشد سلول‌ها، به‌ویژه سلول‌های موجود در شاخساره و برگ‌ها می‌شود. کاهش رشد سلول‌ها در نهایت باعث محدود شدن اندازه اندام‌های گیاه می‌شود و بنابراین یکی از اولین نشانه‌های ملموس تنش شوری را کاهش اندازه‌های طولی گیاه و کوچکی برگ‌ها عنوان کردند. دیوانی و همکاران (Deivanai et al., 2011) نیز در تحقیقات خود نشان دادند که با افزایش میزان شوری، تجمع سدیم و کلر در اندام‌های زمینی و هوایی گیاه افزایش می‌یابد و موجب به‌هم ریختگی غشا، کاهش رشد و نمو و ممانعت از تقسیم و توسعه سلول در گیاه می‌شود. کاهش شدید میزان تولید ماده خشک کل برنج به دلیل حساسیت زیاد آن به تنش شوری نیز توسط ژانی و همکاران (Zhani et al., 2012) گزارش شده است. گزارش‌های دیگر نیز نشان می‌دهند که شوری از طریق اختلال در رشد، موجب کاهش چشم‌گیر عملکرد گیاهان می‌شود (Ashraf et al., 2013; Kanwal et al., 2012). محمدی‌نژاد و همکاران (Mohammadi-Nejad et al., 2010) در بررسی تنوع ژنوتیپ‌های برنج از نظر تحمل به شوری از نشانگرهای ریزماهواره پیوسته به *SalTol* استفاده و ژنوتیپ‌ها را به سه گروه متحمل، نیمه‌متحمل و حساس تقسیم کردند. صبوری و همکاران (Sabouri et al., 2013) نیز جهت ارزیابی تحمل به تنش شوری در مرحله گیاهچه‌ای در ارقام برنج ایرانی از صفات مورفولوژیک و نشانگرهای ریزماهواره استفاده و گزارش کردند که اگرچه گروه‌بندی ارقام برنج ایرانی به متحمل و حساس به شوری بر مبنای صفات

مقایسه قرار گرفتند. برای ایجاد موتاسیون، بذر ارقام برنج به سازمان انرژی اتمی تهران منتقل و توسط اشعه گاما با طول موج ۲۰۰ تا ۲۵۰ گره پرتوتابی شدند. آزمایش‌های مربوط به مطالعات فنوتیپی تحت شرایط هیدروپونیک با دو فاکتورژنوتیپ و شوری به صورت یک آزمایش فاکتوریل در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی با شش تکرار در آزمایشگاه ژنومیکس دانشکده کشاورزی دانشگاه گیلان در سال ۱۳۹۵ به روش گرگوریو و همکاران (Gregorio *et al.*, 1997) اجرا شد.

برای انجام آزمایش، ابتدا تعداد مورد نیاز بذر به‌طور کامل با آب مقطر شسته شدند و سپس جهت ضدعفونی کردن بذرها و جلوگیری از آلودگی‌های احتمالی، به مدت پنج دقیقه در محلول یک درصد هیپوکلریت سدیم قرار گرفتند و مجدداً سه بار و هر بار به مدت پنج دقیقه با آب مقطر شسته شدند. پس از آن، بذرها هر ژنوتیپ به پتری‌های حاوی کاغذ صافی استریل منتقل و برای جوانه‌دار شدن در دستگاه ژرمیناتور در دمای ثابت ۳۵ درجه سلسیوس قرار گرفتند. کشت بذرها در جوانه‌دار در ظروف مخصوص هیدروپونیک حاوی محلول غذایی یوشیدا در روز پنجم تحت شرایط اطافک رشد با دمای ثابت ۲۷ درجه سلسیوس، رطوبت ۷۰ الی ۷۵ درصد و دوره نوری ۱۴ ساعت روشنایی و ۱۰ ساعت تاریکی انجام شد. محلول یوشیدا بعد از دو هفته کاملاً تخلیه و این‌بار ژنوتیپ‌ها به مدت دو هفته تحت شرایط تنش شوری در سه سطح شامل محلول یوشیدا (شاهد آزمایش)، محلول یوشیدا حاوی نمک NaCl با هدایت الکتریکی ۶ دسی‌زیمنس بر متر و محلول یوشیدا حاوی NaCl با هدایت الکتریکی ۱۲ دسی‌زیمنس بر متر قرار گرفتند. در مورد شرایط ۱۲ دسی‌زیمنس بر متر، ژنوتیپ‌ها ابتدا سه روز در شرایط ۶ دسی‌زیمنس بر متر نگهداری و سپس به این محلول غذایی منتقل شدند تا زمان کافی برای تطبیق با محیط را داشته باشند. طی این مدت هر هفته محلول غذایی تعویض و pH و هدایت الکتریکی محلول‌ها هر روز کنترل شد. بعد از اعمال تیمارهای شوری با غلظت ۶ و ۱۲ دسی‌زیمنس بر متر، واکنش ژنوتیپ‌ها ارزیابی و امتیاز آن‌ها برای تحمل به شوری بر اساس روش گرگوریو و همکاران (Gregorio *et al.*, 1997) و مطابق با جدول ۲ تعیین شد.

مورفولوژیک و نشانگرهای مولکولی مطابقت زیادی نداشت، اما تعدادی از نشانگرها می‌توانند به‌عنوان نشانگرهای آگاهی‌بخش جهت مطالعات تحمل به شوری مورد استفاده قرار گیرند. کردرستمی و همکاران (Kordrostami *et al.*, 2016) نیز در آزمایشی که به‌منظور ارزیابی تنوع ژنتیکی و طبقه‌بندی ۴۴ رقم برنج و نیز شناسایی نشانگرهای ریزماهواره آگاهی‌بخش مرتبط با صفات مورفولوژیک با استفاده از تجزیه ارتباطی انجام دادند، نشانگرهای ریزماهواره متصل به ناحیه ژنی *SalTol* را مورد استفاده قرار دادند و به این نتیجه رسیدند که این ناحیه ژنی و نشانگرهای پیوسته با آن روی کروموزوم شماره یک برنج در ارزیابی تنوع و طبقه‌بندی ارقام برنج از نظر تحمل به شوری بسیار مفید و سودمند هستند.

اگرچه مطالعات بسیاری در زمینه تحمل به شوری در برنج صورت گرفته و استفاده از روش‌های مولکولی جدید، سبب پیشرفت مطالعات مربوط به تحمل به شوری در مراحل رشدی بالاتر در برنج شده است، اما هنوز رقم متحمل به شوری به‌ویژه در مرحله گیاهچه‌ای تولید و معرفی نشده است. با توجه به اهمیت تنش شوری و تاثیر چشم‌گیر آن بر کاهش کیفیت و کمیت عملکرد برنج، این تحقیق انجام شد که اهداف آن عبارت بودند از: (۱) بررسی تنوع فنوتیپی ارقام و لاین‌های موتانت برنج بر اساس صفات مورفولوژیک و فیزیولوژیک تحت شرایط تنش شوری، (۲) ارزیابی تنوع مولکولی ژنوتیپ‌ها با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره مرتبط با تحمل به شوری، (۳) غربال ژنوتیپ‌ها برای حساسیت و تحمل به شوری و معرفی لاین‌های موتانت متحمل به شوری بر اساس صفات مورفولوژیک و نشانگرهای ریزماهواره.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی این تحقیق (جدول ۱)، ۴۷ ژنوتیپ برنج شامل ۴۱ لاین موتانت نسل M8 حاصل از پرتوتابی اشعه گاما به چهار رقم برنج (دو رقم محلی ایرانی هاشمی و طارم محلی و دو رقم اصلاح‌شده خزر و فجر) بودند که به همراه ارقام والدینی و دو لاین استاندارد FL478 (متحمل به شوری) و Teqqing (حساس به شوری) در سه سطح شوری (۰، ۶ و ۱۲ دسی‌زیمنس بر متر) مورد ارزیابی و

جدول ۱- رقم‌ها و لاین‌های موتانت استفاده شده در تحقیق حاضر

Table 1. The varieties and mutant lines used in current research

No.	Genotype	Origin	No.	Genotype	Origin
1	M1	Tarom- Iranian local	25	M35	Hashemi- Iranian local
2	M2	Tarom- Iranian local	26	M36	Hashemi- Iranian local
3	M3	Tarom- Iranian local	27	M37	Hashemi- Iranian local
4	M4	Tarom- Iranian local	28	M38	Hashemi- Iranian local
5	M5	Tarom- Iranian local	29	M39	Hashemi- Iranian local
6	M6	Tarom- Iranian local	30	M40	Hashemi- Iranian local
7	M7	Tarom- Iranian local	31	M41	Hashemi- Iranian local
8	M8	Tarom- Iranian local	32	M42	Hashemi- Iranian local
9	M9	Tarom- Iranian local	33	M43	Hashemi- Iranian local
10	M10	Tarom- Iranian local	34	M44	Hashemi- Iranian local
11	M11	Tarom- Iranian local	35	M45	Hashemi- Iranian local
12	M12	Tarom- Iranian local	36	M46	Hashemi- Iranian local
13	M13	Tarom- Iranian local	37	M47	Khazar- improved
14	M14	Fajr- improved	38	M48	Khazar- improved
15	M15	Fajr- improved	39	M49	Khazar- improved
16	M21	Hashemi- Iranian local	40	M54	Khazar- improved
17	M23	Hashemi- Iranian local	41	M56	Khazar- improved
18	M24	Hashemi- Iranian local	42	Tarom	Iranian local
19	M25	Hashemi- Iranian local	43	Hashemi	Iranian local
20	M26	Hashemi- Iranian local	44	Khazar	IR36/TNAU4756
21	M30	Hashemi- Iranian local	45	Fajr	IR62781-175-1-10
22	M32	Hashemi- Iranian local	46	FL478	IRRI
23	M33	Hashemi- Iranian local	47	Teqing	IRRI
24	M34	Hashemi- Iranian local	-	-	-

جدول ۲- نحوه امتیازدهی ژنوتیپ‌ها برای تحمل به شوری بر اساس روش گریگوریو و همکاران (Gregorio *et al.*, 1997)Table 2. Scoring method of the genotypes for salinity tolerance based on Gregorio *et al.* (1997) method

Score	Observation	Tolerance
1	Normal growth, no leaf symptoms	Highly tolerant
3	Nearly normal growth, but leaf tips of few leaves whitish and rolled	Tolerant
5	Growth severely retarded, most leaves rolled	Moderately tolerant
7	Complete cessation of growth, most leaves dry, some plant dying	Susceptible
9	Almost all plants dead or dying	Highly susceptible

موجود در اندام هوایی به وسیله دستگاه فلیم‌فتمتری مدل CL361 ساخت شرکت ELCO در آزمایشگاه خاکشناسی موسسه تحقیقات برنج (رشت) اندازه‌گیری شد. برای محاسبه درصد تغییرات صفات در اثر شوری از رابطه (۱) استفاده شد:

$$YCP = \frac{Y_{NS} - Y_S}{Y_{NS}} \times 100 \quad (1)$$

پس از آن، بوته‌های برنج به‌طور جداگانه برداشت و صفات طول ساقه و ریشه (با استفاده از خط‌کش با دقت ۰/۱ سانتی‌متر)، وزن تر و خشک ساقه و ریشه (به‌وسیله ترازوی ۰/۰۰۱ گرم مدل KERN ABS) و میزان سدیم و پتاسیم اندام هوایی برای هر بوته اندازه‌گیری شد. برای اندازه‌گیری سدیم و پتاسیم اندام هوایی از روش کالرا (Kalra, 1998) استفاده شد و میزان سدیم و پتاسیم

با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۲ انجام شد. در مورد داده‌های مولکولی نیز ابتدا الگوی نواری مشاهده شده در ژل‌های پلی‌آکریل‌آمید بر اساس وجود یا فقدان یک نوار به ترتیب با اعداد یک و صفر مرتب شده و داده‌ها به صورت یک ماتریس ۴۷×۵۰ وارد نرم‌افزار Excel شدند که در آن عدد ۵۰ نشان‌دهنده تعداد آلل مشاهده شده و عدد ۴۷ تعداد ژنوتیپ‌های مطالعه شده است. به منظور گروه‌بندی ارقام بر اساس داده‌های مولکولی نیز از نرم‌افزار Darwin استفاده و تجزیه خوشه‌ای بر مبنای ضریب تشابه جاکارد و روش مرکزی (ادغام بر حسب مرکز خوشه‌ها، UPGMC) که بیشترین ضریب همبستگی کوفنتیک و بهترین شکل دندروگرام را از نظر عدم وجود حالت پله‌ای داشت، انجام شد. تعداد آلل موثر، تنوع ژنی نئی (H_e) و محتوای اطلاعات چندشکل (PIC) برای هر نشانگر (Powell *et al.*, 1996)، با استفاده از نرم‌افزار POPGEN نسخه ۱/۳۲ محاسبه شد:

$$H_e = 1 - \sum_{i=1}^n p_i^2 \quad (2)$$

$$PIC = 1 - \sum_{i=1}^n p_i^2 - \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n p_i^2 p_j^2 \quad (3)$$

در این روابط، p_i و p_j به ترتیب فراوانی آلل‌های i و j و n تعداد آلل‌های مشاهده شده برای هر نشانگر در جمعیت است.

در این رابطه، YCP درصد تغییر صفت در اثر تنش شوری، Y_{NS} میانگین صفت تحت شرایط بدون تنش و Y_S میانگین صفت تحت شرایط تنش است.

به منظور ارزیابی تنوع مولکولی ژنوتیپ‌های مورد مطالعه از دوازده نشانگر SSR استفاده شد. این نشانگرها بر اساس صفات مرتبط با تحمل به شوری از پایگاه اطلاعاتی Gramene بر مبنای ارتباط آن با QTL شناخته شده و بزرگ‌اثر تحمل به شوری (*SalTol*, Thomson *et al.*, 2010; Islam *et al.*, 2012) انتخاب و توالی آن‌ها از همین پایگاه تهیه شد. اطلاعات مربوط به نشانگرها و آغازگرهای مورد استفاده در جدول ۳ ارائه شده است.

تجزیه واریانس داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS نسخه ۹/۲ انجام شد. برای بررسی میزان شباهت‌ها و تفاوت‌های بین ژنوتیپ‌های مورد مطالعه از نظر کلیه صفات مورفولوژیک، تجزیه خوشه‌ای به روش‌های نزدیک‌ترین همسایه‌ها، دورترین همسایه‌ها، UPGMA و حداقل واریانس Ward انجام شد و چون روش Ward دارای بیشترین ضریب همبستگی کوفنتیک و بهترین شکل دندروگرام (عدم وجود حالت پله‌ای یا زنجیره‌ای) بود، این روش انتخاب شد. برش دندروگرام جهت گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها بر اساس بیشترین فاصله بین دو ادغام متوالی انجام و سپس صحت گروه‌بندی حاصل با تجزیه تابع تشخیص ارزیابی شد. هر دو تجزیه خوشه‌ای و تابع تشخیص

جدول ۳- نشانگرهای ریزماهواره مرتبط با QTL بزرگ‌اثر *SalTol* روی کروموزوم شماره یک برنج مورد استفاده در این تحقیق

Table 3. Microsatellite markers linked to the major QTL *SalTol* on rice chromosome No. 1 used in this research

Marker	Forward	Reverse	Related trait
RM8094	AAGTTTGTACACATCGTATAACA	CGCGACCAGTACTACTACTACTA	Resistance score, homeostasis of Na/P in shoots
RM562	CACAACCCACAAACAGCAAG	CTTCCCCCAAAGTTTTAGCC	Na adsorption, P concentration in stem
AP3206	GGAGGAGGAGAGGAAGAAG	GCAAGAATTAATCCATGTGAAAAGA	Na/P ratio in shoot
RM140	TGCTCTTCCCTGGCTCCCCTG	GGCATGCCGAATGAAATGCATG	Seedling survival
RM7075	TATGGACTGGAGCAAACCTC	GGCACAGCACCAATGTCTC	Seedling survival, tolerance score
RM10793	GACTTGCCAACTCCTTCAATTTCG	TCGTGAGTAGCTTCCCTCTCTAC	Tolerance score, seedling length
RM493	TAGCTCCAACAGGATCGACC	GTACGTAACGCGGAAGGTG	Tolerance score, Na content in stem
RM3412	AAAGCAGGTTTTCTCTCTCC	CCCATGTGCAATGTGTCTTC	Na and P content in shoot
RM1069	TTTCCCTGGTTTCAAGCTTACG	AGTACGGTACCTTGATATGGTAG	Na and P content in shoot
RM1287	GTGAAGAAAGCATGGTAAATG	TCAGCTTGCTTGTGGTTAG	Na and P content in shoot
RM5	TGCAACTTCTAGCTGCTCGA	GCATCCGATCTTGATGGG	Na/P ratio
RM490	ATCTGCACACTGCAAACACC	AGCAAGCAGTGCTTTCAGAG	P adsorption

نتایج و بحث

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اثر شوری بر کلیه صفات مورد مطالعه در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود (جدول ۴)، به این مفهوم که شرایط بدون تنش و تنش‌های شوری ۶ و ۱۲ دسی‌زیمنس بر متر اثر متفاوتی روی میانگین صفات در کلیه ژنوتیپ‌ها داشتند. همچنین بین ژنوتیپ‌های مورد مطالعه تفاوت معنی‌داری از نظر کلیه صفات وجود داشت که حاکی از وجود تنوع ژنتیکی بین آن‌ها بود (جدول ۴). برهمکنش ژنوتیپ × شوری نیز برای تمامی صفات معنی‌دار بود، به این مفهوم که واکنش ژنوتیپ‌های مختلف در شرایط متفاوت اسمزی یکسان نبود، به طوری که بعضی از ژنوتیپ‌ها بهترین واکنش را تحت شرایط بدون تنش داشتند و تحت شرایط تنش شوری واکنش مطلوبی نداشتند و برعکس، ژنوتیپ‌هایی که تحت شرایط تنش شوری عملکرد بالاتری تولید کردند، تحت شرایط بدون تنش بهترین نبودند (جدول ۴).

میانگین هر یک از صفات مورد مطالعه تحت سه شرایط آزمایشی و درصد تغییرات آن‌ها تحت تنش‌های شوری ۶ و ۱۲ دسی‌زیمنس بر متر در جدول ۵ ارائه شده است. چنانچه مشاهده می‌شود، تمامی ژنوتیپ‌های مورد مطالعه کاهش معنی‌داری در شاخص‌های رشدی نشان دادند که دلیل آن، حساسیت بالای برنج به تنش شوری در مرحله گیاهچه‌ای است. گزارش شده است که میزان تولید ماده خشک کل برنج به دلیل حساسیت زیاد آن به تنش شوری به شدت کاهش می‌یابد (Zhani et al., 2012). محققین دیگر نیز نشان دادند که با افزایش شوری، تجمع سدیم و کلر در اندام زمینی و هوایی گیاه افزایش می‌یابد و موجب کاهش رشد و نمو، به هم ریختگی غشا، ممانعت از تقسیم و توسعه سلول در گیاه می‌شود (Munns, 2002; Deivanai et al., 2011). شوری به وسیله اختلال در رشد گیاه باعث کاهش چشم‌گیر در عملکرد گیاهان می‌شود (Ashraf et al., 2012; Kanwal et al., 2013). نتایج نشان داد که تنش‌های شوری ۶ و ۱۲ دسی‌زیمنس به ترتیب باعث کاهش ۲۹ و ۴۲ درصدی ارتفاع بوته ژنوتیپ‌های مورد مطالعه شد. تنش اسمزی ناشی از حضور یون‌ها در محیط ریشه و کاهش جذب آب، یک دلیل عمده برای کاهش رشد

و تقسیم سلول‌های گیاه و در نتیجه کاهش ارتفاع بوته می‌باشد. تنش شوری همانند تنش اسمزی عمل می‌کند، به طوری که کمبود آب موجب کاهش تورژسانس سلولی و در نهایت باعث کاهش توسعه سلول‌ها، به ویژه سلول‌های موجود در شاخساره و برگ‌ها می‌شود. کاهش رشد سلول‌ها در نهایت باعث محدود شدن اندازه اندام‌های گیاه می‌شود و بنابراین یکی از اولین نشانه‌های ملموس تنش شوری و خشکی، کاهش اندازه‌های طولی گیاه و کوچکی برگ‌ها است (Munns and Tester, 2008).

تنش شوری ۶ و ۱۲ دسی‌زیمنس بر متر به ترتیب موجب کاهش ۳۵ و ۳۶ درصدی وزن تر ساقه و کاهش ۳۳ و ۵۷ درصدی وزن خشک ساقه شد (جدول ۵). تنش شوری ابتدا باعث کاهش پتانسیل آب در محیط ریشه و در نتیجه تنش اسمزی می‌شود. این تنش باعث کاهش توانایی گیاه در جذب آب و در نهایت کاهش رشد و نمو برگ و رشد را سبب می‌شود. این عامل باعث کاهش قابل ملاحظه وزن تر و خشک شاخساره می‌شود (Munns, 2002; Amirjani, 2011). نتایج مطالعه حاضر نشان داد که ساقه نسبت به ریشه بیشتر تحت تأثیر تنش شوری به ویژه در تنش شوری شدیدتر (۱۲ دسی‌زیمنس بر متر) قرار گرفت، به طوری که تنش شوری ۱۲ دسی‌زیمنس بر متر، نسبت وزن خشک ساقه به ریشه برابر با ۲۱ و نسبت طول ساقه به ریشه ۲۲ بود. این نتایج با یافته‌های سایر مطالعات در یک راستا قرار داشت. بر این اساس، نتایج سایر مطالعات نیز نشان می‌دهد که شوری اثر بیشتری بر کاهش رشد و وزن خشک شاخساره نسبت به ریشه دارد و می‌توان نتیجه گرفت که شاخساره به شوری حساس‌تر از ریشه است (Ping et al., 2005). گزارش‌ها نشان می‌دهند که کاهش طول ساقه در تنش با نمک کلرید سدیم می‌تواند ناشی از آثار منفی این نمک بر میزان فتوسنتز، تغییر در فعالیت آنزیم‌ها، کاهش سنتز پروتئین و نیز کاهش در سطح کربوهیدرات‌ها و هورمون‌های رشد باشد که می‌تواند منجر به بازدارندگی رشد شود (Mazher et al., 2007). این امر را می‌توان از کاهش شدید سبزی‌نگی برگ تحت شرایط شوری ۶ و ۱۲ دسی‌زیمنس بر متر (به ترتیب کاهش ۱۱ و ۴۱ درصدی) نیز دریافت.

جدول ۴- تجزیه واریانس صفات مورفولوژیک مورد مطالعه در قالب آزمایش فاکتوریل بر پایه طرح کاملاً تصادفی

Table 4. Analysis of variance of the morphological traits based on factorial experiment in completely randomized design

Source of variation	df	Mean square													
		Root length	Shoot length	Shoot fresh weight	Shoot dry weight	Root fresh weight	Root dry weight	Tolerance score	Biomass	Shoot to root dry weight ratio	Shoot to root length ratio	Sodium content	Potassium content	Sodium to potassium ratio	SPAD
Salinity (S)	2	910.77**	65596.34**	109.03**	1.49**	10.79**	0.01**	1455.38**	1.75**	545.56**	181.63**	3283.42**	117.54**	80.29**	40.84**
Genotype (G)	46	88.27**	1014.94**	0.94**	0.02**	0.25**	0.001**	14.026**	0.02**	214.13**	3.51**	8.33**	0.84**	20.84**	12.95**
S×G	92	20.49**	194.27**	0.40**	0.01**	0.11**	0.001**	9.92**	0.01**	180.84**	1.19**	7.07**	0.52**	2.67**	12.55**
Error	616	4.98	28.69	0.06	0.001	0.02	0.00001	0.001	0.002	76.11	0.22	0.004	0.002	0.004	8.49
CV (%)		13.41	11.06	6.63	5.91	9.06	4.45	0.04	3.84	5.45	6.78	6.25	8.41	14.57	10.91

تنش شوری ۶ و ۱۲ دسی‌زیمنس به ترتیب باعث کاهش ۳۲ و ۵۵ درصدی وزن زیست‌توده گیاهچه‌ها شد. با توجه به نتایج حاصل، ژنوتیپ‌هایی که از نظر امتیاز مقاومت در دو سطح شوری ۶ و ۱۲ دسی‌زیمنس در جایگاه ژنوتیپ‌های متحمل (۱ و ۳) و نیمه‌متحمل (۵) قرار گرفتند، وزن خشک ریشه، شاخساره، زیست‌توده و طول شاخساره بیشتر و درصد سدیم و پتاسیم کمتری داشتند که با نتایج صیوری و همکاران (Sabouri *et al.*, 2008) مطابقت داشت. اشرف (Ashraf, 1994) عنوان کرد که مقایسه حالات رشدی یک گیاه در شرایط تنش با شرایط بدون تنش می‌تواند به‌عنوان یک معیار مناسب جهت شناسایی مقاومت یا حساسیت به شوری باشد. وی بهترین صفت برای سنجش رشد کلی گیاه را ماده خشک کل گیاهچه (بیوماس روشی) عنوان کرد. همچون مطالعه حاضر، کومار (Kumar *et al.*, 2009) نیز بیان کرد که ارقام متحمل زیست‌توده بیشتری نسبت به ارقام حساس تحت شرایط تنش شوری تولید می‌کنند.

نتایج مطالعات اشرف و هریس (Ashraf and Harris, 2013) نیز نشان داد که تنش شوری با ممانعت از سنتز کلروفیل باعث کاهش سبزیگی برگ می‌شود. تنش شوری از طریق فعال‌سازی آنزیم کلروفیل‌از باعث کاهش شدید سبزیگی برگ می‌شود و از این‌رو، تغییر در میزان کلروفیل می‌تواند به‌عنوان شاخصی برای شناسایی و تفکیک گیاهان متحمل از حساس باشد (Naumann *et al.*, 2008)، زیرا میزان کلروفیل در گونه‌های حساس تحت تنش شوری کاهش می‌یابد (Ashraf and Harris, 2013). همچنین تنش اکسیداتیو باعث تخریب سلول‌های کلروپلاست شده و از این طریق باعث کاهش سبزیگی برگ می‌شود (Santos, 2004; Khafagy *et al.*, 2009). تنش شوری محتوای کاروتنوئید و کلروفیل برگ را به نحو قابل ملاحظه‌ای کاهش می‌دهد (Parida and Das, 2005; Ashraf and Harris, 2013).

جدول ۵- درصد کاهش میانگین صفات مورفولوژیک در اثر تنش‌های شوری ۶ و ۱۲ دسی‌زیمنس بر متر

Table 5. Percentage reduction in mean of morphologic traits due to salinity stresses of 6 and 12 dS.m⁻¹

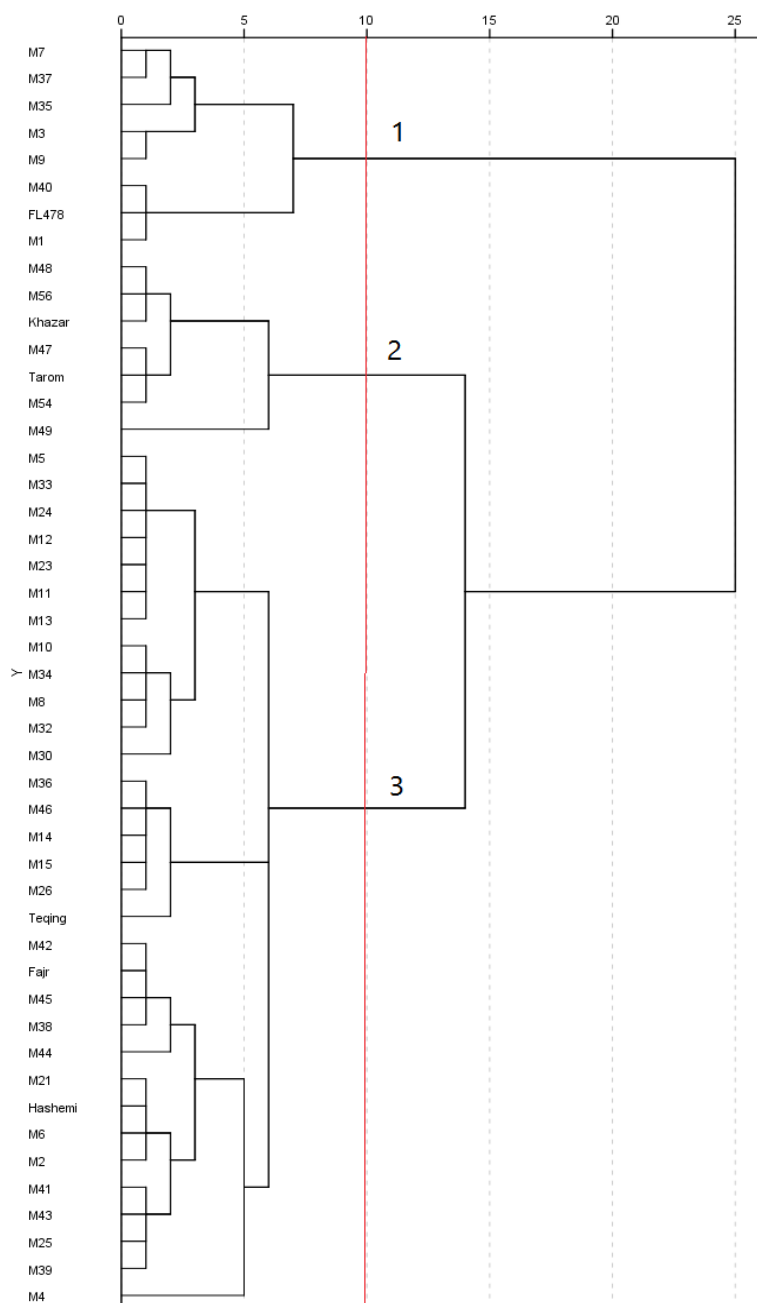
Trait	Trait mean under			Reduction to non-stress conditions (%)	
	Non-stress	Salinity stress (6 dS.m ⁻¹)	Salinity stress (12 dS.m ⁻¹)	Salinity stress (6 dS.m ⁻¹)	Salinity stress (12 dS.m ⁻¹)
Shoot length (cm)	68.26	48.75	39.31	28.58	42.41
Shoot fresh weight (g)	1.47	0.96	0.94	34.69	36.05
Shoot dry weight (g)	0.21	0.14	0.09	33.33	57.14
Root length (cm)	17.41	14.75	12.80	15.28	26.48
Root fresh weight (g)	0.54	0.38	0.37	29.63	31.48
Root dry weight (g)	0.018	0.012	0.011	33.33	38.89
Shoot / root length ratio	4.01	3.56	3.10	11.22	22.69
Shoot / root dry weight ratio	13.18	12.55	10.38	4.78	21.24
Dry biomass (g)	0.22	0.15	0.10	31.82	54.55
SPAD	33.39	29.76	19.60	10.87	41.30

روش گزارش شد. در ضمن با توجه به اهمیت بیشتر تنش شوری ۱۲ دسی‌زیمنس بر متر در تفکیک ژنوتیپ‌ها و مشابهت نسبتاً زیاد نتایج مربوط به تنش ۶ دسی‌زیمنس بر متر با آن، فقط نتایج تجزیه خوشه‌ای مربوط به سطح تنش ۱۲ دسی‌زیمنس بر متر ارایه شد. بر این اساس، ژنوتیپ‌های مورد بررسی در سه گروه اصلی دسته‌بندی شدند (شکل ۱). نخستین گروه، هشت ژنوتیپ شامل لاین‌های موتانت MI،

برای بررسی میزان شباهت‌ها و تفاوت‌های بین ارقام مورد مطالعه از نظر کلیه صفات، تجزیه خوشه‌ای ژنوتیپ‌ها به روش‌های مختلف شامل متوسط فاصله بین و درون گروه‌ها، نزدیکترین و دورترین همسایه‌ها و روش حداقل واریانس Ward انجام شد و گروه‌بندی حاصل از آن‌ها مورد مقایسه قرار گرفت. از آنجایی که روش Ward بیشترین ضریب همبستگی کوفنتیک و بهترین شکل دندروگرام را در هر سه سطح شوری ارایه داد، از این‌رو تنها نتایج این

داشتند (جدول ۶). گروه سوم نیز شامل سایر لاین‌های موتانت بود که در کنار دو رقم فجر و هاشمی و لاین حساس به شوری Teqing قرار گرفتند و از نظر بیشتر صفات مورد مطالعه همانند گروه دوم دارای مقادیر کمی بودند. برای حصول اطمینان از نقطه برش دندروگرام و تعیین تعداد واقعی گروه‌ها از تابع تشخیص استفاده شد که نتایج آن صحت گروه‌بندی حاصل از تجزیه خوشه‌ای را ۱۰۰ درصد نشان داد (جدول ۷).

پاسخ لاین‌های موتانت برنج به تنش شوری در مرحله گیاهچه‌ای به M3، M7، M9، M35، M37 و M40 و لاین متحمل به شوری FL478 را در خود جای داد. ژنوتیپ‌های این گروه مقادیر بسیار بالایی را برای بیشتر صفات نشان دادند و میانگین امتیاز مقاومت ژنوتیپ‌های این گروه نیز ۲/۵۷۶ بود که نشان‌دهنده تحمل این ژنوتیپ‌ها به تنش شوری ۱۲ دسی‌زیمنس بر متر بود (جدول ۶). گروه دوم هفت ژنوتیپ شامل لاین‌های M47، M48، M49، M54، M56 و دو رقم طارم و خزر بود که از نظر بیشتر صفات، مقادیر کمی



شکل ۱- گروه‌بندی ارقام بر اساس صفات مورفولوژیک به روش Ward در سطح شوری ۱۲ دسی‌زیمنس بر متر
Figure 1. Grouping of cultivars based on Ward's morphological traits and Euclidean square square criterion at 12 dS.m⁻¹

جدول ۶- میانگین و تفاوت میانگین هر گروه از میانگین کل در گروه‌های حاصل از تجزیه خوشه‌ای در تنش شوری ۱۲ دسی‌زیمنس بر متر

Table 6. Mean of the each group and it's difference from total mean in the groups from cluster analysis under 12 dS.m⁻¹ salinity stress

Group	Root length (cm)	Shoot length (cm)	Shoot fresh weight (g)	Shoot dry weight (g)	Root fresh weight (g)	Root dry weight (g)	Tolerance score	Biomass (g)	Shoot / root dry weight ratio	Shoot / root length ratio	Sodium content	Potassium content	Sodium / potassium ratio	SPAD	
1	Group mean	38.625	0.201	0.065	15.208	0.162	0.006	2.576	12.817	0.071	23.038	3.000	7.703	2.129	3.679
	Difference from total mean	2.891	0.068	0.015	0.733	0.037	0.002	0.035	-0.699	0.017	3.428	-2.979	0.055	0.054	-0.074
2	Group mean	30.043	0.080	0.033	11.533	0.065	0.002	2.709	15.588	0.035	7.490	7.286	8.433	2.143	4.034
	Difference from total mean	-5.691	-0.054	-0.018	-2.942	-0.060	-0.002	0.169	2.071	-0.020	-12.119	1.307	0.785	0.068	0.281
3	Group mean	36.256	0.128	0.050	14.935	0.130	0.005	2.495	13.238	0.055	21.403	6.438	7.462	2.046	3.711
	Difference from total mean	0.522	-0.005	0.00	0.460	0.004	0.000	-0.046	-0.278	0.000	1.794	0.459	-0.186	-0.029	-0.043

جدول ۷ - ارزیابی صحت خوشه‌بندی ژنوتیپ‌ها در تنش شوری ۱۲ دسی‌زیمنس بر متر با استفاده از تجزیه تابع تشخیص
Table 7. Evaluation of accuracy of the clustering the studied genotypes under 12 dS.m⁻¹ salinity stress using discrimination function analysis

Number/Percent	Group number			Grouping accuracy
	1	2	3	
Number	8	0	0	8
	0	7	0	7
	0	0	32	32
Percent	100	0	0	100
	0	100	0	100
	0	0	100	100
Total accuracy (%)				100

در جایگاه نشانگرهای ریزماهوره نیز بسیار متفاوت است. به‌عنوان مثال تعداد آلل مشاهده شده در نشانگر RM8094 در مطالعه محمدی‌نژاد و همکاران (Mohammadi-Nejad et al., 2010) معادل ۱۴ عدد و در مطالعات صبوری و همکاران (Sabouri et al., 2011) و کردرستمی و همکاران (Kordrostami et al., 2016) معادل ۹ عدد بود که در این مطالعه فقط سه آلل مشاهده شد. برای نشانگر RM3412 نیز تعداد آلل مشاهده شده در مطالعه محمدی‌نژاد و همکاران (Mohammadi-Nejad et al., 2010) ۱۱ عدد و صبوری و همکاران (Sabouri et al., 2013) و کردرستمی و همکاران (Kordrostami et al., 2016) ۹ عدد بود، در حالی که تعداد آلل مشاهده شده برای نشانگر RM3412 در این تحقیق بسیار کمتر و معادل ۶ عدد بود. تفاوت در تعداد آلل‌ها در مکان‌های ژنی مختلف به علت تفاوت در نوع و تعداد ژنوتیپ‌ها و مواد گیاهی مورد استفاده در پژوهش‌های مختلف و احتمالاً به علت تغییر در طول واحد تکراری در اثر وقوع جهش در زمینه‌های ژنتیکی مختلف است که با توجه به وجود نرخ بالای جهش در جایگاه‌های ریزماهوره و تنوع بسیار ارقام مورد مطالعه، باعث تفاوت در نتایج حاصل شده است (Nili et al., 2017).

محتوای اطلاعات چندشکل نیز در این تحقیق برای نشانگرهای SSR در محدوده ۰/۲۴ تا ۰/۶۸ با میانگین ۰/۵۶ بود (جدول ۸). بالاترین میزان PIC برای نشانگرهای RM5 و AP3206 با ارزش ۰/۶۳ و ۰/۶۸ تعیین شد که بیانگر کارایی بالاتر این دو نشانگر در تمایز ژنوتیپ‌های مورد استفاده در این تحقیق بود. میانگین PIC در مطالعه ربانی و همکاران (Rabani et al., 2003) برابر با ۰/۵۷۱، محمدی‌نژاد و همکاران (Mohammadi-Nejad et al., 2010) برابر با ۰/۷۷، ساجیب و همکاران (Sajib et al.,

در این پژوهش از ۱۲ نشانگر ریزماهوره پیوسته با QTL های صفت مقاومت به شوری و QTL بزرگ‌اثر *SalTol* روی کروموزوم شماره یک برنج استفاده شد. در مجموع نشانگرها در بین ۴۷ ژنوتیپ، ۵۰ باند تشکیل دادند که همه آن‌ها (۱۰۰ درصد) چندشکل بودند. میانگین تعداد باندهای چندشکل به ازای هر نشانگر معادل ۴/۱۷ باند بود (جدول ۸). از بین نشانگرهای مورد استفاده، RM3412 با تعداد ۶ باند و نشانگرهای RM493، RM1287 و RM10793 با ۵ باند بیشترین تعداد باند چندشکل را داشتند و سایر نشانگرها ۴ و ۳ باند تشکیل دادند و چون همه آن‌ها چندشکل بودند، توانستند تا اندازه‌ای تنوع ژنتیکی بین ژنوتیپ‌ها را نشان دهند و آن‌ها را از هم تفکیک کنند. محمدی‌نژاد و همکاران (Mohammadi-Nejad et al., 2010) نیز در بررسی ژنوتیپ‌های برنج با نشانگرهای ریزماهوره پیوسته به *SalTol*، ۳ تا ۱۴ آلل مشاهده کردند که در این بین RM8094 یکی از آغازگرهایی بود که با حداکثر تعداد آلل در جایگاه نخست قرار گرفت. صبوری و همکاران (Sabouri et al., 2013) نیز جهت ارزیابی تحمل به تنش شوری ارقام برنج ایرانی از ۲۳ نشانگر ریزماهوره استفاده و در مجموع ۲۳۰ باند (با متوسط ۱۰ آلل برای هر نشانگر) مشاهده کردند. نتایج آن‌ها نیز تفاوت قابل توجهی با نتایج تحقیق حاضر داشت. کردرستمی و همکاران (Kordrostami et al., 2016) در آزمایشی به‌منظور ارزیابی تنوع مولکولی و طبقه‌بندی ۴۴ رقم برنج با استفاده از نشانگرهای ریزماهوره متصل به ناحیه ژنی *SalTol* (نشانگرهای استفاده شده در مطالعه حاضر)، ۸۱ باند چندشکل با متوسط ۶/۷۵ آلل در هر مکان ژنی گزارش کردند که از تحقیق حاضر به مراتب بیشتر بود. نتایج حاصل از پژوهش‌های دیگر در مورد تعداد آلل‌های مشاهده شده

تحقیق مشخص شد که میزان تنوع ژنی بین ژنوتیپ‌ها از ۰/۲۶ تا ۰/۷۳ متغیر بود و بیشترین مقدار آن برای نشانگر AP3206 مشاهده شد (جدول ۸). تنوع ژنی نئی در مطالعه ایواندریک و همکاران (Ivandic *et al.*, 2002) در هر مکان بین ۰/۲۵ تا ۰/۷۹، سرایلو و همکاران (Sarayloo *et al.*, 2015) بین ۰/۳۵۱ تا ۰/۸۴۰ با میانگین ۰/۶۸۶ و در مطالعه مهری بادلو (Mehri Badloo, 2015) بین ۰/۰۳۹ تا ۰/۸۱۹ با میانگین ۰/۶۲۸ گزارش شد که همه آن‌ها میانگین بیشتری از تحقیق حاضر بودند. تفاوت در نتایج را می‌توان به تفاوت در جمعیت‌های به کار رفته و نوع نشانگرهای مورد استفاده نسبت داد. به‌طور کلی بالا بودن میانگین‌های تعداد آلل موثر، شاخص تنوع ژنی نئی و میزان اطلاعات چند شکل در نشانگرهای ریزماهواره بیانگر کارآمدی ریزماهواره‌های مورد استفاده برای تمایز ژنتیکی ژنوتیپ‌های مورد مطالعه بودند. از آنجایی که میانگین تعداد آلل در هر نشانگر ریزماهواره، مناسب بودن آن مکان ژنی را برای تخمین تنوع ژنتیکی نشان می‌دهد، بنابراین نشانگرهای AP3206، RM5، RM3412، RM140 با دارا بودن بیشترین میزان تعداد آلل چندشکل، آلل موثر، شاخص تنوع ژنی نئی و میزان اطلاعات چندشکل به‌عنوان موثرترین نشانگرها جهت تجزیه تنوع ژنتیکی تحمل به شوری در برنج در این تحقیق بودند.

برابر با ۰/۴۸، اله‌قلی‌پور و همکاران (2012) (Allahgholipour *et al.*, 2014) ۰/۷۳۱، سرایلو و همکاران (Sarayloo *et al.*, 2015) ۰/۶۴، مهری بادلو (Mehri Badloo, 2015) برابر با ۰/۵۹۵ و کردرستمی و همکاران (Kordrostami *et al.*, 2016) ۰/۶۹ گزارش شد که مقدار PIC به‌دست آمده در این تحقیق از مقدار PIC گزارش شده در تحقیقات قبلی کم‌تر بود. کم بودن مقدار PIC این تحقیق در مقایسه با تحقیقات مشابه را می‌توان به نوع ژنوتیپ‌های مورد مطالعه نسبت داد، زیرا آن‌ها از ارقام متنوع بومی و اصلاح‌شده استفاده کردند، اما در این تحقیق از لاین‌های موتانت با زمینه ژنتیکی تقریباً مشابه استفاده شد. با این حال، در این تحقیق نیز به جز نشانگر RM10793، سایر نشانگرها از PIC نسبتاً مناسبی برخوردار بودند که دلیل آن انتخاب نشانگرهای SSR مناسب و آگاهی‌بخش با توجه به محتوای اطلاعات چندشکل و قدرت تمایز آن‌ها بر اساس نتایج مطالعات قبلی بود. به هر حال، مقادیر PIC در این آزمایش نیز نشان دادند که نشانگرهای ریزماهواره پیوسته با ژن‌های کنترل‌کننده تحمل به شوری روی کروموزوم شماره یک برنج، چندشکلی بالایی دارند و برای بررسی تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های برنج حتی با زمینه‌های ژنتیکی نزدیک نیز بسیار مناسب هستند. شاخص تنوع ژنی نئی از دیگر شاخص‌های ارزیابی تنوع ژنی در این تحقیق بود. با محاسبه شاخص نئی در این

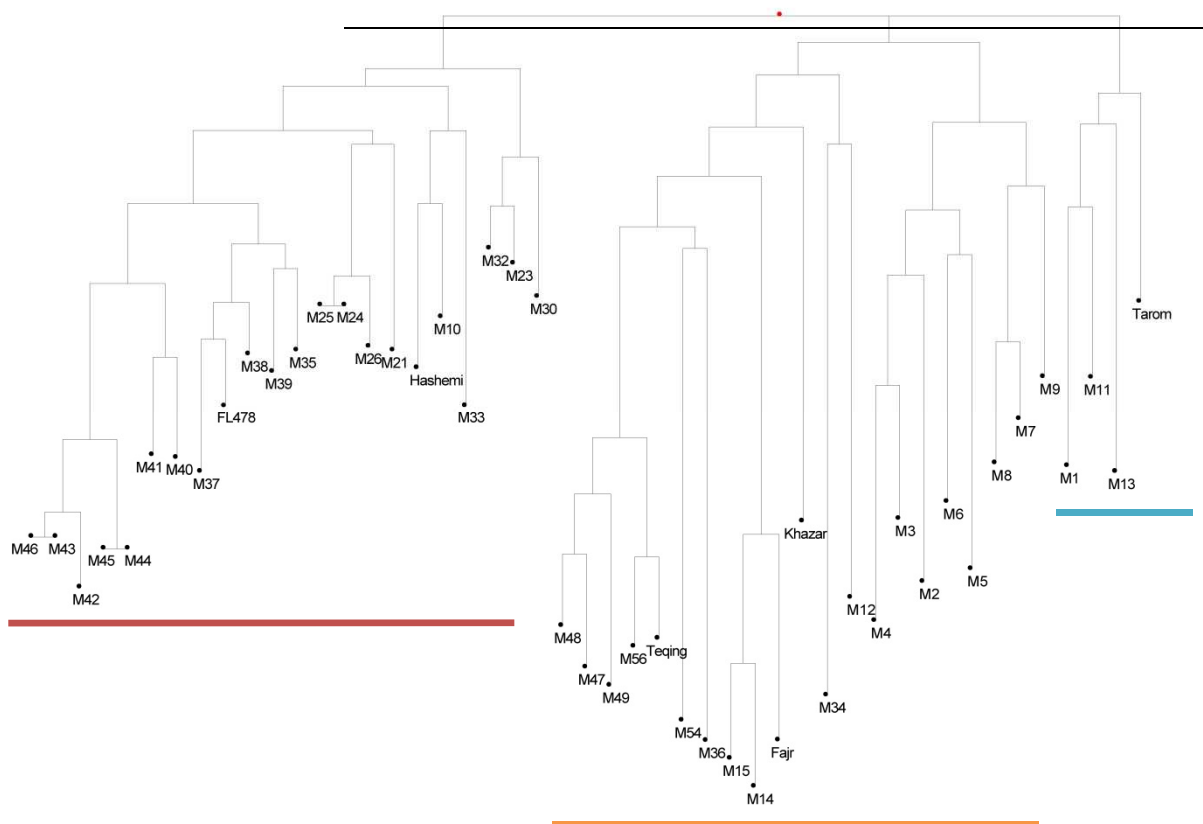
جدول ۸- مقادیر محاسبه شده برای محتوای اطلاعات چندشکل، تعداد آلل موثر و چند شکل، و تنوع ژنی نئی

Table 8. Calculated values for polymorphism information content (PIC), number of observed and effective alleles and Nei's gene diversity

Marker	Polymorphism information content	Number of effective allele	Number of polymorph allele	Nei's gene diversity
RM1287	0.57	4.3	5	0.61
RM8094	0.54	2.1	3	0.62
RM3412	0.59	5.3	6	0.63
RM493	0.58	4.4	5	0.39
RM140	0.56	3.5	4	0.62
RM5	0.63	3.6	4	0.69
RM10793	0.24	3.2	5	0.26
AP3206	0.68	3.7	4	0.73
RM490	0.61	3.4	4	0.58
RM10694	0.56	2.1	3	0.64
RM562	0.56	3.4	4	0.47
RM7075	0.52	2.4	3	0.35
Mean	0.56	3.45	4.17	0.55

دارای دو زیرخوشه بود که لاین‌های M2-M9 حاصل از موتاسیون رقم طارم در زیرخوشه اول و لاین‌های M47-M49، M54، M56 و رقم والدی خزر و دو لاین M14 و M15 با رقم والدی فجر در زیرخوشه دوم قرار گرفتند. لاین‌های موتانت M35، M37، M38، M39، M40 و M41 که همه آن‌ها حاصل موتاسیون رقم بومی هاشمی بودند، به همراه رقم شاهد متحمل به شوری FL478 در یک خوشه قرار گرفتند و در مقابل، لاین‌های موتانت M36، M47، M48، M49، M54 و M56 به همراه رقم شاهد حساس به شوری Teqing در خوشه دیگری گروه‌بندی شدند. میزان تشابه بین گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها با استفاده از نشانگرهای SSR و گروه‌بندی حاصل از صفات مورفولوژیک بر اساس آزمون منتل نیز نسبتاً زیاد و برابر با ۶۵ درصد بود که دلیل آن می‌تواند مربوط به نشانگرهای مورد مطالعه در این تحقیق باشد، به طوری که تمامی آن‌ها از ناحیه ژنومی QTL بزرگ‌اثر تحمل به شوری *SalTol* انتخاب و پیوستگی بالایی با آن داشتند و هر یک از آن‌ها چند صفت مورفولوژیک مطالعه شده در این تحقیق را کنترل می‌کردند.

جهت گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها بر اساس اطلاعات حاصل از نشانگرهای مولکولی، تجزیه خوشه‌ای با روش‌های مختلف و معیارهای تشابه متفاوت انجام شد و دندروگرام‌های حاصل از آن‌ها با استفاده از ضریب همبستگی کوفنتیک و عدم وجود حالت پله‌ای (Chaining) مقایسه شدند. نتایج نشان داد که گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها بر اساس ضریب تشابه جاکارد و روش UPGMC، بهترین روش گروه‌بندی را ارائه داد و ضمن نداشتن حالت پله‌ای در دندروگرام، ضریب همبستگی کوفنتیک بالایی (۰/۸۵) نیز داشت که بیان‌گر کارایی بالای این روش در گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها بود. میزان تشابه بین ژنوتیپ‌ها بر اساس ضریب تشابه جاکارد بین ۱۰ تا ۱۰۰ درصد متغیر بود. برش دندروگرام ژنوتیپ‌ها را در سه خوشه اصلی و چند خوشه فرعی (زیرخوشه) قرار داد (شکل ۲). نتایج نشان داد که لاین‌های موتانت و ارقام والدی آن‌ها با ضریب تشابه بالا در کنار یکدیگر قرار گرفتند، اگرچه در برخی از خوشه‌ها نیز لاین‌های موتانت مشتق از ارقام مختلف در یک خوشه گروه‌بندی شدند. به عنوان مثال، لاین‌های M1، M11 و M13 حاصل از موتاسیون رقم طارم به همراه این رقم در یک خوشه قرار گرفتند. گروه دوم نیز



شکل ۲- دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای ژنوتیپ‌های مورد مطالعه بر اساس نشانگرهای ریزماهواره (SSR)

Figure 2. Dendrogram from cluster analysis of the studied genotypes based on microsatellite (SSR) markers

M40 در کنار لاین شاهد FL478 در یک گروه قرار گرفتند و به عنوان لاین‌های متحمل به شوری شناسایی شدند و در مقابل، رقم‌های فجر و هاشمی و لاین‌های M47، M48، M49، M56 به همراه لاین شاهد حساس به شوری Teqing در خوشه دیگر تحت عنوان حساس به شوری گروه‌بندی شدند. تجزیه خوشه‌ای داده‌های مولکولی نیز ژنوتیپ‌ها را در سه گروه اصلی تفکیک کرد که بر این اساس، لاین‌های موتانت M35، M37 و M40 به همراه رقم شاهد FL478 به عنوان ژنوتیپ‌های متحمل به شوری و لاین‌های موتانت M36، M47، M48، M49، M54 و M56 به همراه رقم شاهد Teqing به عنوان ژنوتیپ‌های حساس به شوری گروه‌بندی شدند. نتیجه جالب توجه، وجود شباهت نسبتاً زیاد این گروه‌بندی با گروه‌بندی حاصل از صفات مورفولوژیک (۶۵ درصد) بود، به طوری که هر دو گروه‌بندی نشان داد که سه لاین موتانت M35، M37 و M40 به همراه رقم شاهد FL478 به عنوان لاین‌های متحمل به شوری و چهار لاین موتانت M47، M48، M49 و M56 به همراه رقم شاهد Teqing به عنوان لاین‌های حساس به شوری بودند. بررسی نشانگرهای مولکولی بر اساس شاخص‌های تنوع نیز نشان داد که همه نشانگرهای ریزماهواره استفاده شده چندشکل بودند که از بین آن‌ها نشانگرهای AP3206، RM5، RM140، RM3412 با دارا بودن بیشترین تعداد آلل چندشکل، تعداد آلل موثر، تنوع ژنی نئی و میزان اطلاعات چندشکل، موثرترین نشانگرها در این تحقیق بودند که به عنوان نشانگرهای مفید و آگاهی‌بخش جهت تجزیه تنوع ژنتیکی تحمل به شوری در برنج معرفی می‌شوند.

لاپیتان و همکاران (Lapitan *et al.*, 2007) در تحقیقات خود هشت رقم از تیپ ژاپونیکا و ۱۶ رقم از تیپ ایندییکا را با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره مورد بررسی قرار دادند و مقادیر PIC و شاخص شانون را به ترتیب ۰/۶۸ و ۰/۷۱ گزارش کردند که بیانگر وجود تنوع ژنتیکی بالا می‌باشد. آن‌ها ژنوتیپ‌ها را از ناحیه تشابه ۴۰ درصد به سه خوشه مجزا با زیرگروه‌هایی در هر خوشه تفکیک کردند و توانستند تیپ ژاپونیکا را به طور کامل از تیپ ایندییکا جدا کنند. محمدی‌نژاد و همکاران (Mohammadi-Nejad *et al.*, 2010) نیز با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره پیوسته با QTL‌های تحمل به شوری توانستند ژنوتیپ‌های مورد مطالعه خود را در سه گروه شامل گروه ژنوتیپ‌های بسیار متحمل، گروه ژنوتیپ‌های متحمل و نسبتاً متحمل و گروه ژنوتیپ‌های حساس و بسیار حساس تقسیم کنند.

نتیجه‌گیری کلی

نتایج حاصل از ارزیابی فنوتیپی ارقام و لاین‌های موتانت برنج نشان داد که ژنوتیپ‌های مورد مطالعه، ضمن داشتن حساسیت کلی به تنش شوری و کاهش رشد، واکنش‌های متفاوتی در برابر تنش شوری داشتند و دارای تنوع قابل توجهی بودند. نتایج تجزیه خوشه‌ای بر اساس صفات مورفولوژیک، لاین‌های موتانت و ارقام والدی آن‌ها را در سه گروه تقسیم کرد، به طوری که لاین‌های حساس و متحمل به شوری از هم تفکیک شدند. بر این اساس، لاین‌های موتانت M1، M3، M7، M9، M35، M37 و

References

- Allahgholipour, M., Farshadfar, E. and Rabiei, B. 2014. Evaluation of molecular diversity in rice (*Oryza sativa* L.) genotypes using microsatellite markers linked with agronomic and grain physico-chemical characteristics. *Iranian Journal of Crop Sciences* 15 (4): 337-354. (In Persian with English Abstract).
- Amirjani, M. R. 2010. Effect of NaCl on some physiological parameters of rice. *European Journal of Biological Sciences* 3 (1): 6-16.
- Arzani, A. 2004. Crop improvement (Translation). 3rd Edition. Isfahan University of Technology Press. 606 p. (In Persian).
- Ashraf, M. 1994. Breeding for salinity tolerance in plants. *Critical Review of Plant Science* 13: 17-42.
- Ashraf, M. and Harris, P. 2013. Photosynthesis under stressful environments: An overview. *Photosynthetica* 51 (2): 163-190.
- Ashraf, M. Y., Awan, A. R. and Mahmood, K. 2012. Rehabilitation of saline ecosystems through cultivation of salt tolerant plants. *Pakistan Journal of Botany* 44: 69-75.

- Deivanai, S., Xavier, R., Vinod, V., Timalata, K. and Lim, O. F. 2011.** Role of exogenous proline in ameliorating salt stress at early stage in two rice cultivars. **Journal of Stress Physiology and Biochemistry** 7 (4): 157-174.
- Fernandez, G. C. 1992.** Effective selection criteria for assessing plant stress tolerance. Proceedings of the International Symposium on Adaptation of Vegetables and Other Food Crops in Temperature and Water Stress. August 13-16, Taiwan.
- Fotookian, M., Talei, A., Ghareyazie, B., Poustini, K. and Shahnejat-Boushehri A. 2004.** Mapping the genes controlling salinity tolerance in rice using microsatellite markers. **Iranian Journal of Agricultural Sciences** 6 (4): 361-373. (In Persian with English Abstract).
- Gregorio, G. B., Senadhira, D. and Mendoza, R. 1997.** Screening rice for salinity tolerance. IRRI. Discussion Paper No. 22. Los Banos, Philippines.
- Islam, M. R., Gregorio, G. B., Salam, M. A., Collard, B. C. Y., Singh, R. K. and Hassan, L. 2012.** Validation of *SalTol* linked markers and haplotype diversity on chromosome 1 of rice. **Molecular Plant Breeding** 3 (10): 103-114.
- Ivandic, V., Hackett, C. A., Nevo, E., Keith, R., Thomas, W. T. B. and Forster, B. 2002.** Analysis of simple sequence repeats (SSR) in wild barley from the fertile crescent: Associations with ecology, geography and flowering time. **Plant Molecular Biology** 48: 511-527.
- Kafi, M., Borzoui, A., Salehi, M., Kamandi, A., Masoumi, A. and Nabati, J. 2007.** Physiology of environmental stresses in plants. (1st Edition). Mashhad University Press. 502 p. (In Persian).
- Kalra, Y. P. 1998.** Handbook of reference methods for plant analysis. CRC Press, London, UK.
- Kanwal, S., Ashraf, M., Shahbaz, M. and Iqbal, M. Y. 2013.** Influence of saline stress on growth, gas exchange, mineral nutrients and non-enzymatic antioxidants in mungbean [*Vigna radiate* (L.) Wilczek]. **Pakistan Journal of Botany** 45 (3): 763-771.
- Khafagy, M. A., Arafat, A. A. and El-Banna, M. F. 2009.** Glycinebetaine and ascorbic acid can alleviate the harmful effects of NaCl salinity in sweet pepper. **Australian Journal of Crop Science** 3 (5): 257-267.
- Kordrostami, M., Rabiei, B. and Hassani Kumleh, H. 2016.** Association analysis, genetic diversity and haplotyping of rice plants under salt stress using SSR markers linked to *SalTol* and morpho-physiological characteristics. **Plant Systematic and Evolution** 7: 871-890.
- Kumar, V., Shriram, V., Nikam, T. D., Narendra, J. and Mahadeo, G. S. 2009.** Antioxidant enzyme activities and protein profiling under salt stress in indica rice genotypes differing in salt tolerance. **Archives of Agronomy and Soil Science** 55 (4): 379-394.
- Lapitan, V. C., Brar, D. S., Abe, T. and Redoña E. D. 2007.** Assessment of genetic diversity of Philippine rice cultivars carrying good quality traits using SSR markers. **Breeding Science** 57 (4): 263-270.
- Mazher, A. M. A., El-Quesni, E. M. F. and Farahat, M. M. 2007.** Responses of ornamental and woody trees to salinity. **World Journal of Agriculture Science** 3 (3): 386-395.
- Mehri Badloo, Z. 2015.** Identifying suitable parents for production high yielding rice hybrids using SSR markers. M. Sc. Dissertation, University of Guilan, Rasht, Iran. (In Persian).
- Mohammadi-Nejad, G., Singh, R. K., Arzani, A., Rezaie, A. M., Sabouri, H. and Gregorio, G. B. 2010.** Evaluation of salinity tolerance in rice genotypes. **International Journal of Plant Production** 4: 199-208.
- Munns, R. 2002.** Comparative physiology of salt and water stress. **Plant, Cell and Environment** 25 (2): 239-250.
- Munns, R. 2005.** Genes and salt tolerance: Bringing them together. **New Phytologist** 167: 645-663.
- Munns, R. and Tester, M. 2008.** Mechanisms of salinity tolerance. **Annual Review of Plant Biology** 59: 651-681.
- Naumann, J. C., Young, D. R. and Anderson, J. E. 2008.** Leaf chlorophyll fluorescence, reflectance and physiological response to freshwater and saltwater flooding in the evergreen shrub, *Myrica cerifera*. **Environmental and Experimental Botany** 63 (1): 402-409.
- Nili, A., Rabiei, B., Allahgholipour, M. and Ebadi, A. A. 2017.** Assessing molecular diversity and genetic relationships among rice (*Oryza sativa* L.) varieties. **Cereal Research** 7 (1): 33-50. (In Persian with English Abstract).
- Parida, A. K. and Das, A. B. 2005.** Salt tolerance and salinity effects on plants: A review. **Ecotoxicology and Environmental Safety** 60 (3): 324-349.

- Ping, A., Inanaga, S., Li, X. J., Eneji, A. E. and Zhu, N. W. 2005.** Interactive effects of salinity and air humidity on two tomato cultivars differing in salt tolerance. **Journal of Plant Nutrition** 28: 459-473.
- Rabbani, M. A., Maruyama, K., Abe, H., Khan, M., Katsura, K., Ito, Y., Yoshiwara, K., Seki, M., Shinozaki, K. and Shinozaki, Y. 2003.** Monitoring expression profiles of rice genes under cold, drought and high salinity stresses and abscisic acid application using cDNA microarray and RNA gel-blot analyses. **Plant Physiology** 133: 1755-1767.
- Sabouri, H., Rezai, A. M. and Moumeni, A. 2008.** Evaluation of salt tolerance in Iranian landrace and improved rice cultivars. **Journal of Science and Technology of Agriculture and Natural Resources** 12 (45): 47-63. (In Persian with English Abstract).
- Sabouri, A., Sabouri, H. and Dadras, A. 2013.** Association analysis of closely linked markers to major QTLs *Saltol* and *SKCI* and salt tolerance-related traits in rice varieties. **Cereal Research** 3 (1): 53-68. (In Persian with English Abstract).
- Sajib, A. M., Musharaf-Hossain, M., Mosnaz, A. T. M. J., Monirul-Islam, M. and Shamsher-Ali, M. 2012.** SSR marker-based molecular characterization and genetic diversity analysis of aromatic landraces of rice. **Journal of Bioscience and Biotechnology** 2: 107-116.
- Santos, V. C. 2004.** Regulation of chlorophyll biosynthesis and degradation by salt stress in sunflower leaves. **Scientia Horticulturae** 130: 93-99.
- Sarayloo, M., Sabouri, H. and Dadras, A. R. 2015.** Assessing genetic diversity of rice genotypes using microsatellite markers and their relationship with morphological characteristics of seedling stage under non- and drought-stress conditions. **Cereal Research** 5 (1): 1-15. (In Persian with English Abstract).
- Thomson, M. J., Ocampo, M., Egdane, J., Rahman, M. A., Sajise, A. G., Adorada, D. L., Tumimbang-Raiz, E., Blumwald, E., Seraj, Z. I., Singh, R. K., Gregorio, G. B. and Ismail, A. M. 2010.** Characterizing the *saltol* quantitative trait locus for salinity tolerance in rice. **Rice** 3: 148-160.
- Zhani, K., Elouer, M. A., Aloui, H. and Hannachi, C. 2012.** Selection of a salt tolerant Tunisian cultivar of chili pepper (*Capsicum frutescens*). **Eurasian Journal of Biosciences** 6: 47-59.



University of Guilan
Faculty of Agricultural
Sciences

Cereal Research
Vol. 8, No. 1, Spring 2018 (15-31)

The response of rice mutant lines to salinity stress at seedling stage using morphological traits and microsatellite markers

Mir-Hesamoddin Hosseini¹, Babak Rabiei^{2*}, Ali Akbar Ebadi³ and Mojtaba Kordrostami⁴

Received: June 18, 2017

Accepted: August 30, 2017

Abstract

Salinity stress is the second major problem and limiting the rice production after drought. To investigate the effects of salinity stress on some important morphological and physiological characteristics of rice, 41 mutant lines from radiation of gamma ray to four rice varieties (two Iranian local varieties, Hashemi and Tarom and two improved varieties, Khazar and Fajr) along with parental varieties and two control lines, FL478 (tolerant to salinity) and Teqing (sensitive to salinity) were studied under three salinity conditions (control, 6 and 12 dS.m⁻¹). The experiment was carried out in factorial experiment based on completely randomized design with six replications. The variation among genotypes were also studied using twelve microsatellite (SSR) markers linked to *SalTol*, a major salinity tolerant QTL. The results of analysis of variance showed significant and considerable differences among the genotypes for all studied traits. The results of cluster analysis of morphological data grouped the studied genotypes into three clusters so that M1, M3, M7, M9, M35, M37 and M40 mutant lines together with the salinity tolerant line FL478 grouped into one cluster, while Hashemi and Fajr varieties and M47, M48, M49 and M56 mutant lines along with the salinity sensitive line Teqing grouped into a similar cluster. The cluster analysis of molecular data also divided the studied genotypes into three main groups. Accordingly, the mutant lines M35, M37 and M40 together with the control variety FL478 were grouped as salinity tolerant and the mutant lines M36, M47, M48, M49, M54 and M56 together with the control variety Teqing as salinity sensitive genotypes. The Mantel test showed a high similarity of about 65% between two cluster analyses which was due to the use of tight linked SSR markers to the *SalTol*, each of them were linked to the several traits studied in this research. As mentioned above, all three salinity tolerant lines identified in the molecular data analysis were also identified in cluster analysis of morphological traits and all four salinity sensitive lines identified in the morphological data analysis were also identified in molecular data analysis. Evaluating the microsatellite markers also showed that the AP3206, RM5, RM3412, RM140 markers were the most suitable and informative markers to assess the genetic variation of salinity tolerance in this research.

Keywords: Salinity sensitivity, Salinity tolerance, *SalTol*

1. M. Sc. Graduated, Dept. of Plant Production and Genetics, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran

2. Prof., Dept. of Plant Production and Genetics, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran

3. Research Assist. Prof., Rice Research Institute of Iran, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Rasht, Iran

4. Ph. D. Graduated, Dept. of Agricultural Biotechnology, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran

* Corresponding author: rabiei@guilan.ac.ir