جهش‌زایی در برنج برای ایجاد تحمل به خشکی و بررسی تنوع ژنتیکی جهش‌یافته‌ها با نشانگر ISSR

اسدالله احمدی‌خواه[1*]، هدا شجاعیان[2] و محمدهادی پهلوانی[2]

[1] **تهران، دانشگاه شهید بهشتی دانشکده فناوریهای نوین، گروه بیوتکنولوژی**

[2] **گرگان، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی، دانشکده تولید گیاهی، گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی**

تاریخ دریافت: ۹۲/۹/۲۰ تاریخ پذیرش: ۹۳/۸/۱۸

چکیده

از تکنیک جهش‌زایی فیزیکی و شیمیایی برای ایجاد تنوع ژنتیکی در بسیاری از گیاهان زراعی استفاده می‌شود و تعداد زیادی لاینهای موتانت مفید از این طریق تولید شده است. در این مطالعه از موتاژن اتیل متان سولفونات (EMS) به منظور ایجاد تنوع ژنتیکی در برنج (رقم ندا) استفاده شد و نقش جهش‌زایی آن در بهبود تحمل به تنش خشکی بررسی شد. لاینهای موتانت نسل M_2 در مرحله جوانه‌زنی و گیاهچه‌ای در شرایط تنش اسمزی با PEG (۰/۸- مگاپاسکال) ارزیابی شدند که منجر به جداسازی ۹ لاین موتانت متحمل به خشکی گردید. این لاینها به همراه رقم مادری در مرحله گیاه کامل در شرایط مزرعه با اعمال آبیاری محدود نیز مورد ارزیابی قرار گرفتند که بر اساس شاخص تحمل به تنش (STI) دو لاین متحمل به خشکی به نامهای MT90 و MT149 شناسایی شدند. برای بررسی سطح تنوع ژنتیکی حاصل از تیمار جهش در لاینهای موتانت، از نشانگرهای ISSR استفاده شد که ۶۹/۴ درصد آنها چندشکلی بین رقم مادری و لاینهای موتانت را نشان دادند. تنوع ژنتیکی حاصل از جهش در ژنوتیپهای مورد مطالعه معادل ۲۳/۵ درصد برآورد شد و تجزیه خوشه‌ای با روش UPGMA آنها را به سه گروه عمده تفکیک کرد که گروههای حاوی لاینهای موتانت نسبت به گروه حاوی رقم مادری در شرایط تنش خشکی هم عملکرد بالاتر و هم شاخص تحمل به تنش بالاتری را نشان دادند. بر اساس نتایج، لاین MT149 به عنوان لاین متحمل به خشکی در هر دو مرحله گیاهچه‌ای و گیاه بالغ معرفی می‌شود. بنابراین می‌توان نتیجه‌گیری کرد که جهش القایی EMS تأثیر مطلوبی در ایجاد لاینهای موتانت متحمل به خشکی داشته و از نشانگرهای ISSR تا حدودی می‌توان برای جداسازی لاینهای موتانت متحمل به خشکی در جمعیتهای حاصل از جهش در برنج استفاده کرد.

واژه‌های کلیدی: برنج، جهش، EMS، خشکی، نشانگر ISSR.

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۱۱۲۷۳۴۰۷۲، پست الکترونیکی: a_ahmadikhah@sbu.ac.ir

مقدمه

امروزه یکی از اهداف محققان بخش کشاورزی در راستای غلبه بر محدودیتهای محیطی و حفظ امنیت غذایی، شناسایی و دستیابی به ارقامی است که در شرایط دشوار از عملکرد مطلوب و پایدار برخوردار باشند (۳ و ۴). آب مولکول مهمی برای تمامی فرآیندهای فیزیولوژیکی گیاهان است که اگر مقدار آن در گیاه ناکافی باشد، گیاه مرحله کم آبی را تجربه می‌کند که اصطلاحاً به آن تنش خشکی می گویند. خشکی عامل اصلی محدود کننده تولیدات کشاورزی است که گیاه را از رسیدن به حداکثر توان محصول‌دهی باز می‌دارد (۱۴ و ۲۹). تحمل به خشکی به معنای توانایی گیاهان زراعی برای تولید محصول اقتصادی با حداقل کاهش عملکرد در شرایط تنش نسبت به شرایط

بدون تنش می‌باشد (۱۵). گیاهان برای سازگار شدن با شرایط کم آبی، مکانیسمهای گوناگونی را توسعه داده‌اند. جنبه‌های ژنتیک مولکولی، امکان پاسخ مناسب و سازگاری با تنش خشکی را به آنها داده است (۱۵). تحمل به خشکی خصوصیت پیچیده‌ای است که با روشهای معمول مربوط به مقاومتهای تک ژنی مانند مقاومت به برخی پاتوژنهای گیاهی، قابل بررسی نیست (۱۳). البته، تجزیه مکانهای خصوصیات کمّی (QTL) دریچه جدیدی به روی محققان برای ردیابی تأثیر پارامترهای ژنتیکی مختلف بر تحمل به خشکی گشوده است. پلی اتیلن گلیکول (PEG) یک پلیمر قابل انعطاف و غیرسمی بوده و می تواند باعث ایجاد فشار اسمزی منفی گردد که این خصوصیت، آن را به یکی از مفیدترین مولکولها برای ایجاد فشار اسمزی منفی در آزمایشهای بیوشیمیایی (به ویژه ایجاد تنش اسمزی) تبدیل کرده است. در بسیاری از آزمایشها به منظور ارزیابی تحمل گیاهان به خشکی در مرحله گیاهچه‌ای، برای شبیه‌سازی تنش خشکی از PEG استفاده می‌شود (۲۴).

جهشهای کوچک یا بزرگ غیر کشنده در ژنوم گیاهان اهمیت بالایی در اصلاح گیاهان دارند (۴۷). جهشهای القایی منبع ارزشمندی برای ایجاد تنوع لازم در برنامه‌های بهبود ژنتیکی گیاهان می‌باشند (۱۰). اتیل متان سولفونات (EMS) به عنوان عامل ایجاد جهشهای نقطه‌ای، باعث پیدایش دامنه گسترده‌ای از آللهای موتانت، مانند از دست دادن کارکرد، به دست آوردن کارکرد یا بروز صفات، تغییر در کارکرد و تولید موتانتهای جدید با خصوصیات ویژه می‌گردد (۳۳). با استفاده از جهشهای القایی واریته‌های پرمحصول و یا واریته‌هایی با خصوصیات کمی و کیفی بهتر در گیاهان مختلف ایجاد شده است. برای مثال، در مطالعه Jana and Roy (2004) (۱۸) موتانتهای مطلوب بهتر از شاهد، از نظر تعداد دانه پر در خوشه و طول خوشه بعد از تیمار با EMS ایجاد شدند. در گندم لاینهای هاپلوئید با اشعه گاما پرتوتابی شدند و موتانتهای دابل هاپلوئید حاصل تحت تنش رطوبتی قرار گرفتند که در نهایت دو لاین موتانت دابل‌هاپلوئید با عملکرد بالاتر، زودرسی، مقاومت به بیماری و تحمل به تنش خشکی شناسایی شدند (۲۱). از اتیل متان سولفونات و اشعه گاما در اصلاح سویا استفاده شده و بعد از چندین بار انتخاب دو موتانت A5 و A15 با عملکرد بالا و سازگاری خوب شناسایی شدند. همچنین، لاینهای متحمل به تنش خشکی نیز در تحقیق آنها شناسایی شدند که تعداد دانه در غلاف زیادی تولید می‌کردند (۳۰). در مطالعه‌ای بذرهای سورگوم با دزهای مختلفی از اشعه گاما پرتوتابی شدند که اشعه گاما به طور معنی‌داری تنوع ژنتیکی را در نسل M_2 افزایش داد. در گیاهان M_2 تعدادی موتانت با خصوصیات زراعی مطلوب شناسایی شدند؛ ازجمله تعداد ۱۰ لاین موتانت متحمل به خشکی به دست آمد. در فصل کم آبی این لاینها بیوماس و عملکرد دانه بالاتری نسبت به واریته مادری دورا و واریته شاهد محلی تولید کردند (۱۷).

برای بررسی تنوع طبیعی گونه‌ها، اکوتیپهای گیاهی و ارقام زراعی و یا تنوع ناشی از جهشهای القایی در گیاهان از نشانگرهای مولکولی استفاده می‌شود. نشانگر مولکولی ISSR (نواحی بین توالیهای تکراری ساده) به دانش قبلی از ژنوم و روشهای طراحی آغازگرهای خاص نیاز ندارد. این تکنیک سریع است و می‌تواند تفاوت میان افراد با قرابت زیاد را آشکار کند. ازجمله مزایای آن می‌توان به داشتن چندین لوکوس چند شکل، قابل کاربرد با تعداد زیادی نمونه و هزینه پایین اشاره کرد (۲). علاوه بر آن ISSRها نسبت به نشانگرهایRAPD قابلیت تکرارپذیری بالاتری به‌دلیل دمای اتصال بالاتر دارند و هزینه آنالیز ISSR نسبت به هزینه برخی نشانگرها مانند AFLP پایین است (۳۷ و ۵۰). از نشانگر ISSR به طور گسترده و موفقیت‌آمیز در مطالعات تنوع ژنتیکی، فیلوژنتیک، نقشه‌های ژنتیکی و بیولوژی تکاملی در محدوده وسیعی از گونه‌های گیاهی استفاده شده است (۱۲ و ۳۹).

کاهش منابع آبی در دسترس برای کشت برنج، اهمیت شناسایی و انتخاب ارقام متحمل به خشکی را که در شرایط تنش بتوانند عملکرد قابل قبولی داشته باشند، دو چندان کرده است (۳۴ و ۴۳). با توجه به موفقیت جهش‌زایی فیزیکی و شیمیایی در ایجاد هزاران موتانت مفید برای خصوصیات مختلف در بسیاری از گیاهان زراعی، این تحقیق با هدف ایجاد تنوع ژنتیکی برای تحمل به خشکی در برنج (رقم تجاری ندا) با استفاده از موتاژن اتیل متان سولفونات (EMS) و شناسایی لاینهای موتانت متحمل به خشکی در مرحله گیاهچه‌ای و گیاه بالغ و بعد بررسی تغییرات ژنتیکی آنها با نشانگرهای ISSR انجام شد.

مواد و روشها

اعمال جهش و تعیین دز مناسب ماده جهش‌زا: در این تحقیق از رقم ندا به عنوان ماده گیاهی برای اعمال تیمار جهش استفاده شد. این لاین دارای عملکرد خوب (بین ۶ تا ۷ تن در هکتار)، میان‌رس (۱۰۵ روز از زمان خزانه‌گیری تا شروع ظهور خوشه)، متحمل نسبت به آفت کرم ساقه-خوار و بیماری بلاست می‌باشد. متوسط ارتفاع آن ۱۰۵ سانتیمتر، مقاوم به ورس، دانه دراز، دارای ۲۶/۲ درصد آمیلوز، دمای ژلاتینی شدن متوسط و بدون عطر و طعم می‌باشد.

برای دزسنجی ماده جهش‌زا، ابتدا ۲۰۰۰ بذر از رقم ندا (حاصل از تک بوته) با هیپوکلریت سدیم ۵ درصد به مدت ۵ دقیقه ضدعفونی گردید و بعد به مدت ۱۶ ساعت در آب مقطر خیسانده شدند. بذرها به چهار قسمت تقسیم گردید و تیمار بذرها با اتیل متان سولفونات (EMS) در غلظتهای ۰، ۰/۰۷۵، ۰/۱ و ۰/۱۵ درصد به مدت ۱۶ ساعت انجام شد (۸). از سیستم هوادهی برای تماس بیشتر ماده جهش‌زا با بذرها استفاده گردید. پس از اتمام تیمار و حذف محلول، بذرها به مدت ۳ ساعت در آب شسته شدند. سپس، تعداد ۱۰۰ بذر از هر دز در سه تکرار در حوله کاغذی مرطوب در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد کشت گردید. پس از ۳ روز تعداد بذرهای جوانه زده شمارش و میانگین درصد جوانه‌زنی برای هر دز محاسبه شد. دز مناسب برای اعمال تیمار اصلی جهش، با محاسبه LD50 دزهای مختلف تعیین شد (۶ و ۸). دز ۰/۱ درصد به عنوان دز مناسب برای ایجاد جهش انتخاب گردید و تعداد حدود ۲۰۰۰ بذر جدید با این دز تیمار شدند.

حد بحرانی تحمل به خشکی در رقم مادری ندا در مرحله جوانه‌زنی: برای تعیین حد بحرانی تحمل به خشکی 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 خشکی در مرحله جوانه‌زنی مشخص شود. برای ارزیابی درجه تحمل رقم ندا، تیمار خشکی با پلی اتیلن گلایکول (PEG) در چهار سطح مختلف فشار اسمزی ۰، ۰/۴- ، ۰/۸- و ۱/۲- مگاپاسکال اعمال شد. از رابطه ۱ برای محاسبه غلظت PEG استفاده شد (۱۹).

$$S = \frac{4-\sqrt{(5.16\times\varphi\times T-560\times\varphi+16)}}{2.58\times T-280}$$ رابطه (۱)

S= پتانسیل اسمزی بر حسب بار؛ φ= فشار اسمزی بر حسب بار؛ T = درجه حرارت بر حسب سانتی‌گراد

بذرهای رقم ندا (۲۰ عدد بذر سالم برای هر تیمار) پس از ضدعفونی با هیپوکلریت ۵ درصد به مدت ۵ دقیقه و شستشو با آب مقطر، در حوله کاغذی در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۴ تکرار 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 با ترازوی دیجیتال در روز هشتم اندازه‌گیری شدند.

غربال لاینهای موتانت متحمل به خشکی در مرحله جوانه‌زنی و گیاهچه‌ای: پس از تیمار با ماده جهش‌زا بذرهای جوانه‌دار شده نسل 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 خشکی در رقم ندا در مرحله جوانه‌زنی نشان داد که بهترین تیمار برای غربال لاینهای موتانت متحمل به خشکی تیمار ۰/۸- مگاپاسکال PEG می‌باشد، بنابراین محلولی با پتانسیل فوق تهیه گردید 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 ۲۵ درجه همراه با شاهد (۲۰ بذر سالم از رقم ندا) تیمار شدند. پس از ۸ روز طول ریشه‌چه و ساقه‌چه و وزن تر گیاهچه‌ها اندازه‌گیری شد (۸) و در نهایت موتانتهای احتمالی متحمل، به مزرعه انتقال یافتند.

کشت لاینهای متحمل به خشکی در مزرعه: در اردیبهشت سال ۱۳۹۰ بذور جوانه زده مربوط به هر لاین موتانت M_2 در خزانه کشت شدند. پس از ۳۰ روز گیاهچه‌های لاینهای موتانت به همراه شاهد (رقم مادری ندا) به زمین اصلی واقع در مزرعه تحقیقاتی شماره ۱ دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان انتقال داده شدند. برای اجرای آزمایش یک بلوک به عنوان شاهد (آبیاری کامل به صورت غرقابی مداوم) و یک بلوک برای اعمال تیمار آبیاری محدود (دو روز آبیاری و یک روز خشکی از یک هفته پس از نشاکاری تا رسیدن کامل) در نظر گرفته شد. در هر بلوک ۸ تکرار از هر ژنوتیپ نشاء گردید. یک هفته پس از کشت و استقرار گیاهچه‌ها در مزرعه تیمار آبیاری محدود اعمال گردید. در زمانهای مناسب، خصوصیاتی همانند 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.

استخراج DNA و تکثیر با نشانگرهای ISSR: DNA با استفاده از روش تغییر یافته CTAB (۵) استخراج شد. برای تعیین کمّیت و کیفیت DNA استخراجی از الکتروفورز ژل آگارز ۰/۸ درصد در بافر TBE استفاده شد. برای بررسی سطح تنوع مولکولی حاصل از تیمار جهش از ۱۰ آغازگر ISSR استفاده شد (جدول ۱). 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 ۱/۵ درصد حاوی اتیدیوم بروماید (۰/۵ میکرو گرم بر میکرولیتر) در بافر TBE تفکیک شدند. برای مشخص کردن طول قطعات از نشانگر اندازه مولکولی 100 bp ladder استفاده شد. عکسبرداری از ژلها با استفاده از دستگاه ژل داک (ساخت شرکت یووی تک انگلیس) انجام شد.

پروفیل حرارتی PCR برای آغازگرهای ISSR به صورت زیر بود: ۹۴ درجه بمدت ۵ دقیقه؛ ۳۵ چرخه در ۹۴ درجه بمدت ۳۰ ثانیه، ۴۸ درجه بمدت ۳۵ ثانیه، ۷۲ درجه بمدت ۹۰ ثانیه؛ و سرانجام ۷۲ درجه بمدت ۵ دقیقه.

تجزیه آماری داده‌های کمّی: برای آنالیز آماری داده‌های کمّی مربوط به مرحله گیاهچه‌ای از آزمون t تک نمونه‌ای و داده‌های کمّی مربوط به آزمایش مزرعه‌ای از تجزیه واریانس با استفاده از نرم‌افزار SPSS10 (۲۲) استفاده شد. مقایسه میانگینها با آزمون دانکن در سطح ۵ و ۱ درصد انجام شد. شاخص تحمل به تنش (STI) برای ارزیابی واکنش تحمل ژنوتیپها به تنش شوری مورد استفاده قرار گرفت که طبق رابطه ۲ محاسبه شد (۱).

$$STI = Yp * Ys/Mp^2 \qquad \text{رابطه (۲)}$$

جدول ۱- آغازگرهای ISSR استفاده شده در این تحقیق

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

R و Y در ترکیب آغازگر به مفهوم دجنره بودن آن آغازگر می‌باشد. R نشان‌دهنده نوکلئوتیدهای A یا G؛ Y نشان‌دهنده نوکلئوتیدهای C یا T.

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.

آنالیز داده‌های مولکولی: باندهای حاصل از تکثیر با نشانگرهای ISSR به صورت ۱ (وجود باند) و ۰ (عدم وجود باند) امتیازدهی شدند، سپس با استفاده از نرم افزار PopGene32 (۴۹) میزان چندشکلی، مقدار اطلاعات چندشکلی، فاصله ژنی نئی، شاخص اطلاعات شانون و ... محاسبه گردید. میزان چندشکلی با تقسیم تعداد لوکوسهای چندشکل بر تعداد کل لوکوسها محاسبه شد. مقدار اطلاعات نسبی نشانگرهای مولکولی از طریق محاسبه مقدار اطلاعات چندشکلی (PIC) طبق رابطه ۳ محاسبه گردید (۷).

$$\mathrm{PIC} = 1 - \sum_{j}^{n} Pij^2 \qquad \text{رابطه (۳)}$$

که در آن Pij فراوانی آلل j برای نشانگر i می‌باشد که برای همه آللها (n آلل) جمع زده می‌شود. فاصله ژنتیکی نئی (۳۱) بین ژنوتیپها (H) از رابطه ۴ محاسبه شد.

$$H = 1 - [Nx,y/(Nx,+Ny)] \qquad \text{رابطه (۴)}$$

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. شاخص تنوع ژنی شانون (H`) از رابطه ۵ محاسبه شد (۲۵).

$$H` = \sum -(Pi * LnPi) \qquad \text{رابطه (۵)}$$

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

نتایج

حد بحرانی تحمل به خشکی در رقم مادری ندا: با توجه به اینکه غربال لاینهای موتانت نسل M_2 از نظر تحمل به خشکی هدف اصلی این مطالعه بود، نخستین گام در این راستا تعیین حد بحرانی تحمل به خشکی در رقم مادری ندا بود. نتایج تجزیه واریانس نشان داد که تیمار خشکی (PEG) بر طول ساقه‌چه، طول ریشه‌چه و وزن تر گیاهچه رقم مادری ندا اثر بسیار معنی‌داری داشت (جدول ۲). فشار اسمزی ۰/۴- مگاپاسکال نه تنها باعث افت خصوصیات رشد و نموی گیاهچه نشد، بلکه آنها را تحریک نیز کرد، به طوری که میزان رشد ساقه‌چه، ریشه‌چه و وزن تر گیاهچه نسبت به تیمار شاهد (آب مقطر) به ترتیب حدود ۱۷۱ درصد، ۱۸۸ درصد و ۲۷ درصد افزایش نشان داد. اما با افزایش فشار اسمزی به ۰/۸- مگاپاسکال خصوصیات مورد مطالعه کاهش یافتند. سرانجام در فشار ۱/۲- مگاپاسکال این خصوصیات به پایین‌ترین حد خود

رسیدند. با توجه به پاسخ رقم مادری به این تیمارها، فشار ۰/۸- مگاپاسکال به عنوان حد بحرانی تحمل خشکی در رقم ندا تعیین شد (شکل ۱).

غربال لاینهای موتانت متحمل به خشکی در مرحله جوانه‌زنی و گیاهچه‌ای: بذرهای ۲۱۲ لاین موتانت نسل M_2 تحت تیمار PEG در فشار اسمزی ۰/۸- قرار گرفتند و سه خصوصیت گیاهچه‌ای در آنها به همراه رقم مادری (ندا) ارزیابی شد که از این میان، تنها ۶۹ لاین موفق به تولید ریشه‌چه و ساقه‌چه شدند، بنابراین وزن تر کل گیاهچه تنها در این ۶۹ لاین اندازه‌گیری شد. آزمون t نشان داد که از نظر هر سه صفت فوق تفاوت معنی‌داری میان لاینهای موتانت با رقم مادری وجود داشت (جدول ۳). اما در هر سه مورد تفاوت میانگین موتانتها با رقم مادری منفی بوده است، هر چند که در بین موتانتها لاینهایی با طول ساقه‌چه و وزن تر گیاهچه بالاتر از شاهد نیز مشاهده شد.

جدول ۲- تجزیه واریانس اثر PEG بر خصوصیات رشدی گیاهچه در رقم مادری ندا

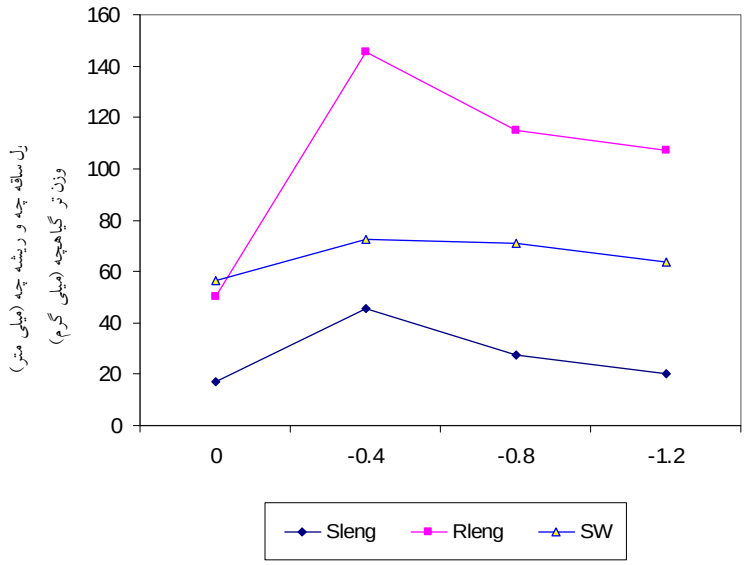
منبع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات		
		طول ساقه‌چه	طول ریشه‌چه	وزن تر گیاهچه
تیمار PEG	۴	۳۵/۳۶۳**	۴۸۴/۰۲۹**	۱/۷۵۶**
خطا	۱۲	۰/۱۰۸	۰/۷۰۱	۰/۰۰۲

**: به مفهوم معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد می‌باشد.

جدول ۳- آزمون t برای سه صفت گیاهچه‌ای در شرایط تنش خشکی (فشار اسمزی ۰/۸- مگاپاسکال)

صفت	آماره t	تفاوت میانگین موتانتها با شاهد	انحراف معیار	کمینه	بیشینه	شاهد (ندا)
طول ساقه‌چه (mm)	-۴/۰۹*	-۶/۹۸/۴۴	۱۴/۲۶	۰/۴	۵۹/۹	۲۷/۷۴
طول ریشه‌چه (mm)	-۲۷/۶۲*	-۴۵/۵۶	۲۵/۹۲	۰/۸	۷۸/۷	۱۱۴/۹
وزن تر گیاهچه (mg)	-۲۱/۱۱*	-۲۹/۴۵	۲۸/۶۵	۳۲۷	۸۹۹	۷۱۱/۵

*: نشان‌دهنده معنی‌دار بودن تفاوت لاینهای موتانت با شاهد در سطح ۵ درصد می‌باشد.



شکل ۱- روند رشد ریشه‌چه، ساقه‌چه و وزن تر گیاهچه رقم مادری ندا در پتانسیلهای مختلف PEG

طول ساقه‌چه (Sleng)، طول ریشه‌چه (Rleng) و وزن تر گیاهچه (SW) با علائم و رنگهای مختلف نشان داده شده است.

بر اساس تجزیه خوشه‌ای با روش وارد، ژنوتیپها در چهار گروه اصلی حساس، نسبتاً حساس، نسبتاً متحمل و متحمل به خشکی قرار گرفتند (جدول ۴). تعداد ۹ لاین موتانت در گروه حساس، ۳۷ لاین موتانت در گروه نسبتاً حساس، ۱۳ لاین موتانت به همراه رقم مادری در گروه نسبتاً متحمل و ۱۰ لاین موتانت در گروه متحمل گروه‌بندی شدند.

برای اعتبارسنجی این گروه‌بندی، تجزیه واریانس بر روی ژنوتیپهای داخل هر گروه انجام شد که نشان داد تفاوت بسیار معنی‌داری میان گروههای به دست آمده با تجزیه خوشه‌ای وجود داشت. مقایسه میانگینها نشان داد که تفاوت چهار گروه برای هر سه صفت مورد مطالعه معنی-دار بود (جدول ۴). اما باید توجه کرد که در مورد طول ریشه‌چه حتی بیشینه این صفت در گروه لاینهای متحمل کمتر از رقم مادری بود (جدول ۳).

میانگین سه خصوصیت گیاهچه‌ای مربوط به ۱۰ لاین موتانت واقع در گروه متحمل در جدول ۵ آورده شده است. از میان این لاینها، لاین MT106 به دلیل داشتن مقادیر میانگین نامطلوب از ادامه ارزیابی حذف گردید و ۹ لاین دیگر به همراه رقم مادری در شرایط آبیاری محدود مورد ارزیابی مزرعه‌ای قرار گرفتند.

بررسی لاینهای موتانت انتخابی برای تحمل به خشکی در شرایط مزرعه: گیاهچه‌های ۹ لاین موتانت انتخاب شده در مرحله گیاهچه‌ای به همراه شاهد به زمین اصلی منتقل شدند و از مرحله پنجه‌زنی تا رسیدن کامل در شرایط آبیاری کامل و همچنین آبیاری محدود با برنامه دو روز آبیاری و یک روز عدم آبیاری مورد ارزیابی قرار گرفتند. تجزیه واریانس بر روی صفات مختلف نشان داد که از نظر خصوصیاتی مانند عملکرد بوته، ارتفاع بوته، تعداد پنجه، بیوماس و طول خوشه تفاوت معنی‌داری بین سطوح آبیاری و بین ژنوتیپها وجود داشت (جدول ۶)؛ اما اثر متقابل خشکی × ژنوتیپ فقط برای بیوماس و عملکرد بوته به ترتیب در سطح ۱ و ۵ درصد معنی‌دار شد.

جدول ۴- گروه‌بندی ژنوتیپهای مورد مطالعه با روش UPGMA بر اساس خصوصیات رشدی گیاهچه در شرایط تنش PEG

	خطای معیار (S.E.)	گروه ۱ (حساس)	گروه ۲ (نسبتا حساس)	گروه ۳ (نسبتا متحمل)	گروه ۴ (متحمل)
تعداد لاینها	-	۹ لاین	۳۷ لاین	۱۳ لاین + رقم مادری	۱۰ لاین
میانگین طول ساقه‌چه (mm)	۰/۸۷۱	۱/۲۲[d]	۱۵/۹۲[c]	۲۵/۹۴[b]	۴۶/۷۹[a]
میانگین طول ریشه‌چه (mm)	۱/۶۶۶	۱۳/۵۰[c]	۱۴/۲۳[c]	۵۳/۴۱[b]	۷۰/۱۹[a]
میانگین وزن تر گیاهچه (mg)	۱/۹۷۷	۴۳۵/۵۵[d]	۴۷۳/۲۷[c]	۶۷۱/۷۴[b]	۸۰۳/۸۸[a]

جدول ۵- میانگین صفات گیاهچه‌ای در ۱۰ لاین موتانت متحمل به خشکی به همراه شاهد در مرحله گیاهچه‌ای (تعداد نمونه برای هر ژنوتیپ ۱۰ بوته بود)

	ندا	MT10	MT18	MT90	MT106	MT117	MT122	MT124	MT136	MT149	MT171
طول ساقه‌چه (mm)	۲۷/۷۴	۵۹/۹	۵۱/۵	۴۵/۷	۳۸/۱	۴۷/۲	۴۲/۲	۴۰/۹	۵۳/۴	۳۸/۹	۵۰/۱
طول ریشه‌چه (mm)	۱۱۴/۹	۷۲/۸	۷۴/۳	۶۴/۹	۵۸/۴	۷۸/۷	۶۸/۴	۶۵/۷	۷۶/۹	۷۸/۱	۶۳/۷
وزن تر گیاهچه (mg)	۷۱۱/۵	۸۳۴	۸۹۹	۸۵۵	۷۰۱	۸۴۷	۷۲۳	۸۱۴	۷۶۳	۷۹۵	۸۰۸

جدول ۶- تجزیه واریانس اثر تیمار خشکی، ژنوتیپ و اثر متقابل آنها بر صفات مورد مطالعه

منبع تغییرات	درجه آزادی	عملکرد	ارتفاع بوته	تعداد پنجه	زمان خوشه‌دهی	وزن ۱۰۰ دانه	بیوماس
تکرار	۷	۲۱۱/۵۱۷ $^{n.s}$	۳۷/۲۷۶ **	۶۶/۱۰۴ *	۰/۰۵۸ ^{ns}	۴۵/۸۷۱ **	۲۷۹۰/۸۱۷ ^{ns}
آبیاری	۱	۲۸۷۱/۶۰۲ **	۱۸۷۹/۷۸۹ **	۵۶۱/۷۷۴ **	۰/۰۰۵ ^{ns}	۱/۲۷۰ ^{ns}	۹۲۱۵۸/۰۶۲ **
ژنوتیپ	۸	۵۶۶/۹۰۵ **	۷۲/۸۲۶ **	۱۸۹/۱۵۰ **	۰/۰۳۷ $^{n.s}$	۴۶/۵۹۶ **	۲۴۹۱۶/۲۲۶ **
خشکی×ژنوتیپ	۸	۲۹۶/۷۶۰ *	۱۸/۴۴۳ ^{ns}	۵۴/۰۶۷ ^{ns}	۰/۰۲۶ ^{ns}	۳/۱۰۵ ^{ns}	۶۸۶۰/۴۶۵ **
خطا	۱۱۹	۱۲۱/۲۵۰	۱۱/۵۵۹	۲۸/۶۹۲	۰/۰۳۰	۱۴/۴۹۱	۱۶۳۸/۳۱۷

ns، * و **: به‌ترتیب نشان‌دهنده غیرمعنی‌دار بودن و معنی‌دار بودن تفاوتها در سطح ۵ و ۱ درصد می‌باشد.

ادامه جدول ۶-

منبع تغییرات	درجه آزادی	طول خوشه	تعداد کل دانه	تعداد دانه پر	تعداد دانه پوک	درصد باروری	درصد عقیمی
تکرار	۷	۰/۹۷۵ ^{ns}	۵۶۶/۹۷۰ ^{ns}	۲۲۴/۹۷۸ ^{ns}	۱۹۶/۲۳۴ **	۱۳۹/۵۲۶ **	۱۳۹/۵۲۶ **
آبیاری	۱	۲۰/۸۶۵ **	۲۰۸/۳۰۴ ^{ns}	۴۶/۱۲۶ ^{ns}	۵۸/۳۸۷ ^{ns}	۲۸/۸۱۲ ^{ns}	۲۸/۸۱۲ ^{ns}
ژنوتیپ	۸	۲/۹۶۲ **	۲۷۳/۰۳۴ ^{ns}	۱۵۳/۷۰۴ ^{ns}	۵۲/۲۱۷ ^{ns}	۳۴/۱۶۷ ^{ns}	۳۴/۱۶۷ ^{ns}
خشکی×ژنوتیپ	۸	۰/۶۰۱ ^{ns}	۱۲۵/۲۵۱ ^{ns}	۱۵۹/۳۳۲ ^{ns}	۳۴/۲۹۸ ^{ns}	۳۶/۰۰۳ ^{ns}	۳۶/۰۰۳ ^{ns}
خطا	۱۱۹	۰/۸۹۰	۲۹۶/۳۲۳	۲۳۶/۸۴۹	۳۸/۴۹۵	۳۲/۴۵۱	۳۲/۴۵۱

بررسی اثر کلی تیمار خشکی نشان داد که برنامه آبیاری محدود بر برخی صفات مورد مطالعه شامل عملکرد، ارتفاع بوته، تعداد پنجه، طول خوشه و بیوماس تأثیر منفی بسیار معنی‌داری داشت (جدول ۷)، به طوری که شدیدترین تأثیر منفی را به ترتیب بر بیوماس (۲۹/۶ درصد)، عملکرد بوته (۲۱/۹ درصد) و تعداد پنجه (۲۱/۱ درصد) بر جای گذاشت. در عوض صفت زمان خوشه‌دهی و صفات مرتبط با دانه (شامل وزن صد دانه، تعداد دانه کل، تعداد دانه پر و درصد باروری) کاهش معنی‌داری نشان ندادند.

مقایسه میانگین عملکرد ژنوتیپها در شرایط تنش آبی نشان داد که چهار لاین موتانت دارای عملکرد بالاتری نسبت به رقم مادری بودند، اما فقط سه لاین موتانت MT149، MT90 و MT117 نسبت به رقم مادری از نظر متوسط عملکرد به طور محسوسی بالاتر بودند (شکل ۲).

محاسبه شاخص تحمل به تنش (STI) نشان داد که لاینهای MT149 و MT90 دارای STI بالاتر قابل ملاحظه‌ای (به ترتیب ۱۳۸/۵ و ۱۰۳/۱ درصد) نسبت به بقیه لاینها و نیز رقم مادری بودند (جدول ۸).

بررسی مولکولی لاینهای موتانت انتخابی برای تحمل به تنش خشکی: برای بررسی سطح تنوع مولکولی حاصل از تیمار جهش در ۹ لاین موتانت متحمل به خشکی، از ۹ آغازگر ISSR استفاده شد که تولید ۶۲ نشانگر را قابل امتیازدهی کرد. ۴۳ عدد از نشانگرها (۶۹/۴ درصد) چندشکلی میان رقم مادری و لاینهای موتانت را آشکار کردند. در شکل ۳ نمونه‌ای از تکثیر ژنوتیپهای مورد مطالعه با آغازگر ISSR6 نشان داده شده است.

تجزیه داده‌های مولکولی حاکی از تفاوت فاحش میان لاینهای موتانت و لاین مادری ندا بود. شاخص تنوع ژنتیکی نی ۲۳/۵ درصد و شاخص تنوع شانون ۳۵/۵ درصد محاسبه شد. بیشترین فاصله ژنتیکی رقم مادری با لاین موتانت MT149 (۵۲ درصد) و کمترین فاصله ژنتیکی آن با لاین موتانت MT10 (۴ درصد) به دست آمد.

تجزیه خوشه‌ای با روش UPGMA و بر اساس ضریب تشابه نئی ژنوتیپها را به سه گروه عمده تفکیک کرد که گروه اول شامل رقم مادری ندا به علاوه دو موتانت MT10 و MT18 و گروه دوم شامل ۶ لاین موتانت دیگر بود؛ در حالی که در گروه سوم تنها لاین موتانت MT149 قرار گرفت (شکل ۴).

جدول ۷- مقایسه اثر کلی آبیاری کامل و آبیاری محدود بر صفات مختلف در شرایط مزرعه

متغیر	سطح آبیاری	میانگین	خطای معیار	تفاوت دو سطح آبیاری	تغییر در شرایط تنش آبی (٪)
عملکرد بوته	کامل	۴۶/۹۶	۱/۸۶۱	−۱۰/۲۹**	
	محدود	۳۶/۶۷	۱/۸۶۱		−۲۱/۹۱
ارتفاع بوته	کامل	۹۱/۷۵	۰/۵۷۵	−۸/۳۳**	
	محدود	۸۳/۴۳	۰/۵۷۵		−۹/۰۷
تعداد پنجه	کامل	۲۱/۶۱	۰/۹۰۵	−۴/۵۵**	
	محدود	۱۷/۰۶	۰/۹۰۵		−۲۱/۰۶
وزن صد دانه	کامل	۲/۷۶	۰/۰۲۹	−۰/۱۳ns	
	محدود	۲/۷۵	۰/۰۲۹		−۴/۷۱
زمان خوشه‌دهی	کامل	۹۳/۷۶	۰/۶۴۴	−۰/۲۲ns	
	محدود	۹۳/۵۴	۰/۶۴۴		−۰/۲۳
بیوماس (وزن تر)	کامل	۱۹۶/۸۴	۶/۸۴۲	−۵۸/۳۰**	
	محدود	۱۳۸/۵۴	۶/۸۴۲		−۲۹/۶۱
طول خوشه	کامل	۲۳/۹۱	۰/۱۵۹	−۰/۸۸**	
	محدود	۲۳/۰۴	۰/۱۵۹		−۳/۶۶
تعداد کل دانه	کامل	۹۶/۷۹	۲/۹۱۰	−۲/۷۷ns	
	محدود	۹۴/۰۲	۲/۹۱۰		−۲/۸۶
تعداد دانه پر	کامل	۸۴/۳۰	۲/۶۰۲	−۱/۳۰ns	
	محدود	۸۲/۹۹	۲/۶۰۲		−۱/۵۴
درصد باروری	کامل	۸۷/۲۱	۰/۹۶۳	۱/۰۴ns	
	محدود	۸۸/۲۴	۰/۹۶۳		۱/۱۸

ns، * و **: به‌ترتیب نشان‌دهنده غیرمعنی‌دار بودن و معنی‌دار بودن تفاوت‌ها در سطح ۵ و ۱ درصد می‌باشد.

جدول ۸- عملکرد تک بوته و شاخص تحمل به تنش (STI) در شرایط بدون تنش و تنش در رقم مادری و لاینهای موتانت انتخابی برای تحمل به خشکی

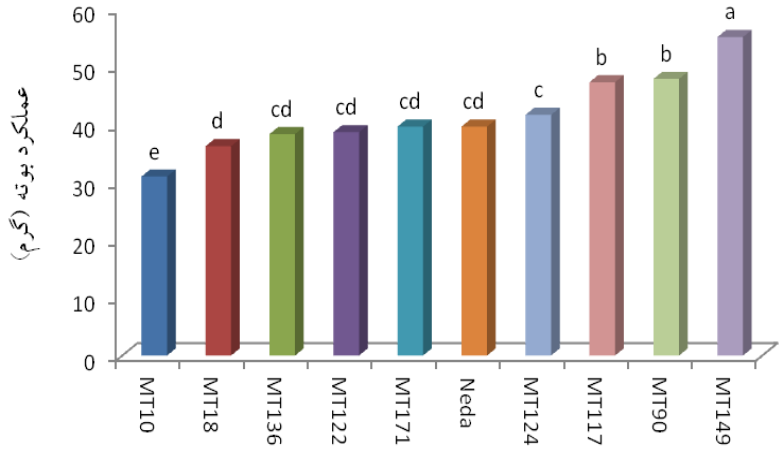
ژنوتیپ عملکرد	ندا	MT10	MT18	MT90	MT117	MT122	MT124	MT136	MT149	MT171
شرایط بدون تنش (gr)	۴۳/۲	۳۲/۴*	۳۷/۹ns	۵۰/۴*	۶۲/۲*	۴۶/۹ns	۴۵/۴ns	۴۵/۱ns	۶۲/۶*	۴۴/۵ns
شرایط تنش (gr)	۳۶/۰	۳۲/۲ns	۳۴/۴ns	۴۵/۳*	۲۹/۸*	۳۰/۴*	۴۴/۸*	۳۸/۲ns	۴۹/۰*	۳۴/۷ns
شاخص تحمل به تنش	۷۰/۲	۴۷/۱	۵۸/۹	۱۰۳/۱	۸۳/۷	۶۴/۴	۹۱/۸	۷۳/۸	۱۳۸/۵	۶۹/۷

ns: تفاوت با شاهد (رقم مادری) غیرمعنی‌دار است؛ *: تفاوت با شاهد معنی‌دار است.

میانگین عملکرد بوته در شرایط بدون تنش و تنش برای گروه یک به ترتیب ۳۷/۸ و ۳۴/۲ گرم در بوته، برای گروه دو به ترتیب ۴۹/۱ و ۳۷/۲ گرم در بوته و برای گروه سه به ترتیب ۶۲/۶ و ۴۹ گرم در بوته به دست آمد. میانگین شاخص تحمل به تنش (STI) برای گروه یک ۵۲/۱ درصد، برای گروه دو ۷۳/۵ درصد و برای تک لاین موجود در گروه سه ۱۲۳/۵ درصد محاسبه شد (جدول ۹).

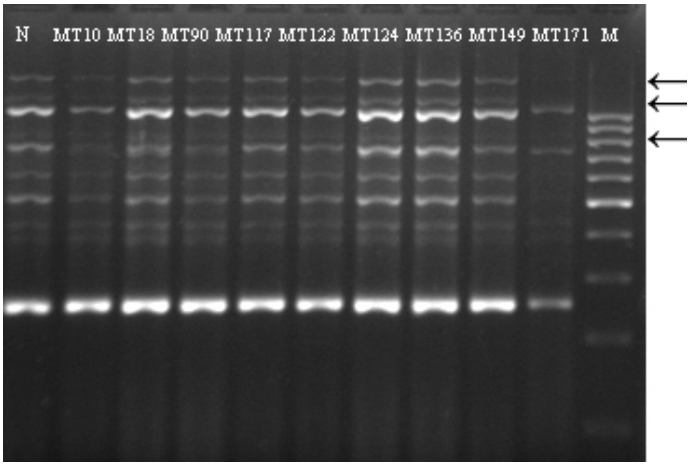
جدول ۹- عملکرد گیاه کامل و شاخص تحمل به تنش (STI) در شرایط بدون تنش و تنش در گروههای به‌دست آمده با تجزیه خوشه‌ای بر اساس نشانگرهای ISSR

گروه	شرایط بدون تنش (gr)	شرایط تنش (gr)	متوسط عملکرد دو محیط (gr)	STI (%)
۱	۳۷/۸	۳۴/۲	۳۶/۰	۵۲/۱
۲	۴۹/۱	۳۷/۲	۴۳/۱	۷۳/۵
۳	۶۲/۶	۴۹/۰	۵۵/۸	۱۲۳/۵



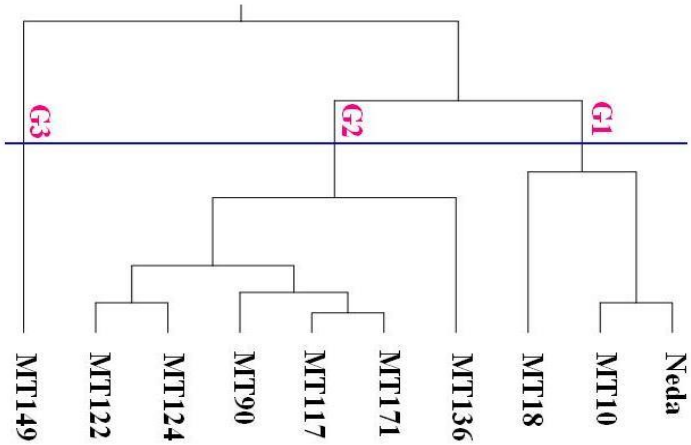
شکل ۲- مقایسه میانگین عملکرد بوته بین رقم مادری (شاهد) و لاینهای موتانت انتخابی در شرایط آبیاری محدود

ژنوتیپهای فاقد اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد با حروف مشترک نشان داده شده است.



شکل ۳- الگوی باندهی ژنوتیپهای مورد مطالعه با آغازگر ISSR6

N: رقم مادری ندا؛ M: نشانگر اندازه مولکولی ۱۰۰bp ladder. برخی باندهای چندشکل با پیکان مشخص شده است.



شکل ۴- گروه‌بندی لاینهای موتانت متحمل به خشکی به همراه رقم مادری شاهد بر اساس الگوی باندی آغازگرهای ISSR با روش UPGMAp

بحث

استفاده از جهش از دیرباز توسط پژوهشگران در بسیاری از کشورها متداول بوده و از آن برای ایجاد مواد ژنتیکی جدید با هدف بهبود خواص کمّی و کیفی مختلف سود جسته‌اند (۹، ۱۱، ۲۰، ۲۷، ۳۵، ۳۸، ۴۰ و ۴۶). معنی‌دار شدن آماره t در هر سه صفت گیاهچه‌ای در تیمار خشکی (جدول ۳)، بیانگر تأثیرگذاری جهش در ایجاد تنوع در خصوصیات رشدی گیاهچه بود. به طور کلی میانگین هر سه صفت گیاهچه‌ای در لاینهای موتانت پایین‌تر از رقم مادری بود. اما لاینهایی با ارزش‌های بالاتر از رقم مادری از نظر دو خصوصیت طول ساقه‌چه و وزن تر گیاهچه شناسایی شدند که بررسی بیشتر نشان داد در ۱۰ لاین موتانت انتخابی (جدول ۴)، رشد ساقه‌چه و وزن تر گیاهچه نسبت به رقم مادری افزایش ولی رشد ریشه‌چه کاهش نشان داد. لاینهایی با افزایش ۳۲/۱ میلی‌متر در طول ساقه‌چه (بیش از ۱۱۸ درصد بهبود) و ۱۸۷/۵ میلی‌گرم در وزن تر گیاهچه (۲۶/۴ درصد بهبود) به دست آمدند. این نتایج نشان دهنده قابلیت استفاده از جهش برای ایجاد تنوع در ارقام زراعی گیاهان می‌باشد که در مطالعات دیگر نیز گزارش شده است. در مطالعه‌ای با استفاده از اشعه گاما بر روی رقم برنج موسی طارم، لاینهای پرمحصول و مقاوم به خوابیدگی شناسایی شدند (۲۶). همچنین، Shehata et al. (2009) (۴۱) با استفاده از جهش در برنج جاسمین مصری، تنوع خوبی را در بین مواد آزمایشی برای کیفیت دانه و عطر و طعم دانه گزارش کردند. Wongswad et al. (2005) (۴۸) به وسیله جهش با EMS در برنج، لاینهای موتانتی با برگهای طویل ایجاد کردند. در سایر مطالعات لاینهای بدون کرک (۲۳)، موتانتهای آلبینو، سبز سیر و مایل به زرد (۳۶) و نیز لاینهای بدون ریشک در گندم (۴۴) در اثر جهش ایجاد شد. همچنین، با استفاده از تکنیک جهش، لاینهای زودرس در برنج (۴۱)، گندم (۲۱) و موز (۳۲) ایجاد شد.

در گروه‌بندی انجام شده بر اساس خصوصیات رشدی گیاهچه تحت تنش اِعمال شده با PEG، اغلب لاینها در گروه حساس و نسبتاً حساس و رقم مادری ندا به همراه ۱۳ لاین دیگر در گروه نسبتاً متحمل واقع شدند و تنها ۱۰ لاین موتانت در گروه متحمل قرار گرفتند که تعداد ۹ لاین از میان آنها انتخاب و در شرایط مزرعه تحت رژیم آبیاری محدود ارزیابی شدند. تمام صفات مورد بررسی در مزرعه تحت تیمار آبیاری محدود نسبت به شاهد (آبیاری کامل) کاهش نشان دادند که البته این کاهش در مورد وزن ۱۰۰ دانه، زمان خوشه‌دهی، تعداد کل دانه و درصد باروری

معنی‌دار نبود، بنابراین از نظر این خصوصیات لاینهای تحت تنش و بدون تنش تقریباً با هم برابر بودند. در حالی که تنش خشکی در صفات عملکرد، ارتفاع بوته، تعداد پنجه، بیوماس و طول خوشه کاهش بسیار معنی‌داری را به وجود آورد. عملکرد بوته به طور معنی‌داری (حدود ۲۲ درصد) در شرایط تنش خشکی نسبت به شاهد کاهش نشان داد. اثر متقابل خشکی و ژنوتیپ فقط در مورد صفات عملکرد و بیوماس معنی‌دار شد که نشان می‌دهد این دو صفت در ژنوتیپهای مختلف به رژیم آبیاری واکنش متفاوتی نشان می‌دهند.

مقایسه میانگین عملکرد تک بوته در شرایط تنش بین لاینهای موتانت انتخابی و رقم مادری نشان داد که لاینهای موتانت MT90 و MT149 از نظر متوسط عملکرد نسبت به رقم شاهد به ترتیب ۹/۳ و ۱۳/۳ گرم افزایش معنی‌داری نشان دادند. شاخص تحمل به تنش نیز در این لاینها نسبت به شاهد به ترتیب ۳۳ و ۶۸ درصد افزایش نشان داد، بنابراین به عنوان لاینهای متحمل به خشکی شناسایی شدند. به خصوص لاین MT149 که در بررسیهای مولکولی نیز در دسته جداگانه‌ای قرار گرفت و بیشترین فاصله ژنتیکی را با رقم مادری نشان داد (شکل ۴). این امر نشان‌دهنده هماهنگی میان داده‌های فنوتیپی و مولکولی می‌باشد. البته شناسایی لاینهای موتانت متحمل به خشکی توسط سایر محققان در گندم (۲۱)، سویا (۳۰) و سورگوم (۱۷) نیز گزارش شده است.

استفاده از ۹ آغازگر ISSR توانست تولید ۶۲ نشانگر با ۷۰ درصد چندشکلی میان رقم مادری و لاینهای موتانت ایجاد کند. چندشکلیهای آشکار شده توسط نشانگرها و میزان شاخصهای تنوع ژنتیکی، نشان‌دهنده ایجاد تنوع در رقم مادری بر اثر جهش با EMS و تفاوت فاحش بین رقم مادری و لاینهای موتانت بود. شاخص تنوع ژنتیکی نئی ۲۳/۵ درصد محاسبه شد که نشان دهنده تأثیر تیمار جهش‌زا در جهت ایجاد تغییرات کافی در سطح DNA برای ایجاد تنوع مطلوب برای اِعمال انتخاب توسط به‌نژادگر می‌باشد. ژنوتیپهای مورد مطالعه در تجزیه خوشه‌ای بر اساس داده‌های مولکولی، در سه گروه جداگانه قرار گرفتند (شکل ۴). شاخص تحمل به تنش در گروه دوم و سوم که دربردارنده لاینهای موتانت بودند از گروه اول که لاین مادری در آن جای داشت، به طور محسوسی بالاتر بود (جدول ۹). عملکرد بوته نیز در شرایط تنش در لاینهای گروه دوم و سوم بالاتر از گروه اول بود. البته غربال لاینهای موتانت با استفاده از نشانگرهای مولکولی و بررسی چندشکلی ناشی از جهش در ارقام مادری و لاینهای موتانت توسط سایر محققان نیز انجام شده است و در مطالعات مربوطه ارقام مادری به خوبی از لاینهای موتانت متمایز شده‌اند. برای مثال، Shehzad et al. (2011) (۴۲) با استفاده از نشانگر SSR و Hoang et al. (2009) (۱۶) با نشانگرهای RAPD-PCR و RAMP-PCR، Miri et al. (2009) (۲۸) با نشانگرهای RAPD و OPJ، Nogueira et al. (2011) (۳۲) و Tarinejad (2013) (۴۵) با نشانگرهای ISSR توانستند تفاوت ژنتیکی بین ارقام مادری و لاینهای موتانت انتخابی را آشکار کنند. بر اساس نتایج این تحقیق، می‌توان نتیجه‌گیری کرد که تکنیک جهش برای ایجاد لاینهای موتانت متحمل به خشکی در برنج مطلوب می‌باشد و از نشانگرهای ISSR می‌توان تا حدودی برای جداسازی و شناسایی لاینهای موتانت در جمعیتهای حاصل از جهش در برنج استفاده کرد.

منابع

۱- احمدی‌خواه ا (۱۳۸۹). اصلاح نباتات تکمیلی. انتشارات دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان. ۴۸۰ ص.

۲- احمدی‌خواه ا (۱۳۹۱). ژنتیک تکمیلی (چاپ دوم). انتشارات دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان. ۳۶۰ ص.

۳- اسفندیاری ع.، و و. عنایتی (۱۳۹۲). بررسی تغییرات پارامترهای فلوئورسانس کلروفیل a در دو رقم گندم دوروم در پاسخ به شوری. مجله پژوهش‌های گیاهی (مجله زیست‌شناسی ایران)، جلد ۲۶، شماره ۴، صفحات ۳۸۴-۳۷۵.

۴- نصیبی ف.، خ. منوچهری کلانتری، و م.م. یعقوبی (۱۳۹۰). مقایسه اثر پیش تیمار سدیم نیتروپروساید و آرژینین بر برخی پاسخهای فیزیولوژیکی گیاه گوجه فرنگی () تحت تنش کم آبی. مجله زیست شناسی ایران، جلد ۲۴، شماره ۶، صفحات ۸۴۷-۸۳۳.

5- Ahmadikhah, A. (2009). A rapid mini-prep DNA extraction method in rice. Afr. J. Biotechnol. 8(2), 323-27.

6- Anbarasan. K., Sivalingam, D., Rajendran, R., Anbazhagan, M.,.Chidambaram, A.A. (2013). Studies on the mutagenic effect of EMS on seed germination and seedling characters of Sesame (*Sesamum indicum* L.) Var.T MV3. Inter. J. Res. Biol. Sci. 3(1), 68-70.

7- Anderson, J.A., Churchill, J.E., Autrique, S.D., Tanksley, S., Sorrells, M.E. (1993). Optimizing parental selection for genetic linkage maps. Genome 36, 181–188.

8- Benjavad Talebi, A., Benjavad Talebi, A., Shahrokhifar, B. (2012). Ethyl methane sulphonate (EMS) induced mutagenesis in Malaysian rice (cv. MR219) for lethal dose determination. Am. J. Plant Sci. 3, 1661-1665.

9- Bodnar, A.L., Scott, M.P. (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.

10- Bughio, H.R., Asad, M.A., Odhano, I. ., Bughio, M.S., Khan, M.A., Mastoi, N.N. (2007). Sustainable rice production through the use of mutation breeding. Pak. J. Bot. 39(7), 2457-2461.

11- Cheema, A.A., Saleem, M.Y., Awan, M.A. (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.

12- Cheghamirza, K., Koveza, O.V., Konovalov, F.A., Gostimskii, S.A. (2004). Identification and mapping of *chi115* gene and DNA markers linked to it in pea (*Pisum sativum* L.). Genet. 40, 909–915.

13- Crute, J.R., Pink, D.A.C. (1996). Genetics and utilization of pathogen resistance in plants. Plant Cell 8, 1747-1717.

14 Dey, M.M., Upadhyaya, H.K. (1996). Yield loss due to drought, cold and submergence in Asia. In: Evenson RE, Herdt RW, Hossain M (eds), Rice Research in Asia: Progress and Priorities. CAB International, Wallingford, UK. pp 291–303.

15- Hirt, H., Shinozaki, K. (2004). Plant responses to abiotic stress. Springer-Verlag, Berlin.

16- Hoang, T.M.L., De Filippis, L.F., Le, X.T. (2009). Salt tolerance and screening for genetic changes in rice mutants after gamma irradiation using RAPD and microsatellite (RAMP) markers. Open Hort. J. 2, 62-69.

17- Human, S., Sihono, H. (2010). Sorghum Breeding for Improved Drought Tolerance Using Induced Mutation with Gamma Irradiation. J. Agron. Indonesia 2, 95–99.

18- Jana, M.K., Roy, K. (2004). Induced quantitative mutation in rice. Rad. Bot. 13, 245-257.

19- Kaufman, M.R., Eckard, A.N. (1971). Evalution of stress control by polyethylene glycols by analysis of guttation. Plant Physiol. 47, 453- 456.

20- Khademian, R., Babaeian Jelodar, N., Kianoosh, Gh. (2004). Study of gamma radiation mutagenesis effects on some Iranian rice cultivars. Khazar Res. Agric. Sci. Nat. Resour. 2(4), 16-26.

21- Khan, A.J., Hassan, S., Tariq, M., Khan, T. (2001). Haploidy breeding and mutagenesis for drought tolerance in wheat. Euphytica 120, 409–414.

22- Kinnear, P.R., Colin, D.G. (2000). SPSS for Windows made simple: Release 10. Hove, UK: Psychology Press.

23- Lee, G.H., Lee, S.Y., 2002. Selection of stable mutants from cultured rice anthers treated with ethyl methane sulfonic acid. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 71, 165–17.

24- Macar, T.K., Ozlem, T., Ekmekci, Y. (2009). Effect of deficit induced by PEG and NaCl on chickpea (*Cicer arientinum* L.) cultivars and lines at early seedling stages. Gazi Uni. J. Sci. 22 (1), 5-14.

25- Magurran, A.E. (1988). Ecological diversity and its measurement. Princeton University Press, Princeton, NJ.

26- Majd, F., Rahimi, M., Rezazadeh, M.R. (2002). Development of resistant lines to logging and

polymorphism and its application in plant breeding. Euphytica 128, 9–17.

38- Saleem, M.Y., Mukhtar, Z., Cheema, A.A., Atta, B.M. (2005). Induced mutation and in vitro techniques as a method to induce salt tolerance in Basmati rice (*Oryza sativa* L.). Inter. J. Envir. Sci. Technol. 2(2), 41-145.

39- Salimath, S.S., de Oliveira, A.C., Godwin, I.D., Bennetzen, J.L. (1995). Assessment of genome origins and genetic diversity in the genus *Eleusine* with DNA markers. Genome 38, 757-763.

40- Sayed, O.E.E., Rizkalla, A.A., Sabri, S.R.S. (2007). *In vitro* Mutagenesis for genetic improvement of salinity tolerance in wheat. J. Agric. Biol. Sci. 4(5), 377-383.

41- Shehata, S.M., Allah, A.A., Zayed, B.A. (2009). Development of salt tolerant rice lines through mutation breeding. J. Agric. Res. 5(4), 954-963.

42- Shehzad, T., Allah, A.B.D., Ammar, M.H., Abdelkhalik, A.F. (2011). Agronomic and molecular evaluation of mutant rice (*Oryza sativa* L.) lines in Egypt Megahed Helmy and Amr Farouk. Pak. J. Bot. 43(2), 1183-1194.

43- Shobbar, Z.S., Malboobi, M.A., Karimzadeh, Gh., Jalali Javaran, M., Mohammadi Nejad, Gh., Bennett, J. (2008). Drought stress and plant hormonal impact on rice peduncle elongation. Iran. J. Biol. 21(3), 411-420.

44- Singh, N.K., Balyan, H.S. (2009). Induced mutations in bread wheat (Triticum aestivum L.) CV. 'Kharchia 65' for reduced plant height and improve grain quality traits. Adv. Biol. Res. 3 (5-6), 215-221.

45- Tarinejad, A. (2013). Classification of closely related wheat cultivars with ISSR marker. Tech. J. Eng. Appl. Sci. 3 (13): 1331-1337.

46- Van Harten, A.M. (1998). Mutation breeding: theory and practical applications. Cambridge University Press, London, UK.

47- Vasline, Y.A. (2013). An investigation on induced mutations in rice (*Oryza sativa* L.). Plant Archv. 13(1), 555-557.

48- 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.

high-yielding in rice gamma-irradiation- induced mutagenesis. J. Nucl. Technol. 26, 37-43.

27- Micke, A. (1999). Mutation and in vitro mutation breeding. Bahar Samiullah Khan, Kalani Publishers, Ludhiana, India. pp 1-19.

28- Miri, S.M., Mousavi, A., Naghavi, M.R., Mirzaii, M., Talaei, A.R., Naserian Khiabani, B. (2009). Analysis of induced mutants of salinity resistant banana (*Musa acuminata* cv. Dwarf Cavendish) using morphological and molecular markers. Iran. J. Biotechnol. 7(2), 86-92.

29- Mitra, J. (2001). Genetics and genetic improvement of drought resistance in crop plants. Curr. Sci. 80, 758-763.

30- Mohamad, O., Loo, M.W., Mohd Nazir, B., Rusli, I., Herman, S., Bakhendri, S. (2009). Drought tolerance in sorghum and soybean. Forum for Nuclear Cooperation in Asia (FNCA).

31- Nei, M. (1978). Analysis of gene diversity in subdivided populations. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 70(12), 3321-3323.

32- Nogueira, P.K., Amorim, E.P., Ferreira, C.U.F., Amorim, V.B.O., Santos, L., Silva Ledo, C.A., Silva, S.O. (2011). Agronomic and molecular characterization of gamma ray induced banana (*Musa sp*.) mutants using a multivariate statistical algorithm. Euphytica 178, 151–158

33- Penmetsa, R.V., Cook, D.R. (2000). Production and characterization of diverse developmental mutants of *Medicago truncatula*. Plant physiol. 123, 1387–1398.

34- Radaei Alamoli, Z., Abdollahian-Noghabi, M., Akbari, Gh., Roozbeh, F., Sadat Noori, S.A. (2010). Effect of water stress induced by solid medium of poly ethylene glycol (PEG 6000) on the seedling characteristics of sugar beet genotypes. Iran. J. Crop Sci. 12(3), 279-290.

35- 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.

36- Reddi, S.T.V.V., Reddi, V.R. (1984). Frequency and spectrum of chlorophyll mutants induced in rice by chemical mutagens. Theor. Appl. Genet. 67, 231-233.

37- Reddy, P.M., Sarla, N., Siddiq, E.A. (2002). Inter simple sequence repeat (ISSR)

49- Yeh, F.C., Yang, R.C., Boyle, T.B.J., Ye, Z.H., Mao, J.X. (1997). POPGENE, the User-friendly shareware for population genetic analysis.molecular biology andbiotechnology centre, University of Alberta, Canada.

50- Zietkiewicz, E., Rafalski, A., Labuda, D. (1994). Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. Genomics 20, 176-183.

Mutagenesis in rice to develop drought tolerance and assessment of genetic variability of mutants using ISSR marker

Ahmadikhah A[1], Shojaeian H[2] and Pahlevani MH[2]

[1] Biotechnology Dept., Faculty of Modern Technologies, Shahid Beheshti University, Tehran, I.R. of Iran

[2] Plant Breeding and Biotechnology Dept., Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, I.R. of Iran

Abstract

Physical and chemical mutagenesis techniques are used for creating genetic variability in many crop plants and several desire mutant lines have been developed by mutagenesis. In this research, EMS mutagen was applied to create genetic variability in rice (cv. Neda), and its mutagenesis effect was investigated in drought tolerance improvement. M_2 mutants were evaluated at germinating and seedling stages under osmotic stress of PEG (-0.8 MPa) which resulted to isolating 9 drought tolerant lines. The lines along with their original cultivar also were evaluated in field under restricted irrigation regime which two mutants viz. MT90 and MT149 based on stress tolerance index (STI) were identified as drought tolerant lines. ISSR markers were used to assess genetic variability induced by mutation in mutant lines, 69.4 percent of which detected polymorphism between original cultivar and mutant lines. Mutation-induced genetic variation was estimated equal to 23.5 percent in the studied genotypes and cluster analysis using UPGMA method differentiated them into three main classes which mutants-containing groups produced higher yield and STI relative to original cultivar group under drought stress. Based on the results, MT149 mutant can be introduced as a drought tolerant line at both seedling and whole plant stages. It can be concluded that EMS-induced mutation had a desire effect in developing drought tolerant mutants and ISSR markers can be applied for differentiating drought tolerant mutants in rice mutation derived populations.

Key words: Drought, EMS, ISSR marker, Mutation, Rice.