

## بررسی تنوع ژنتیکی لاین‌های جهش یافته متحمل به شوری در گندم نان با استفاده از نشانگر مولکولی ISSR

### Evaluation of genetic diversity in salinity tolerance of wheat mutant lines using ISSR molecular marker

آمنه قاسمی مصرمی<sup>۱</sup>، سعید نواب پور<sup>۱\*</sup>، احد یامچی<sup>۱</sup>، سعداله هوشمند<sup>۲</sup>

۱- به ترتیب دانش آموخته کارشناسی ارشد، دانشیار، استادیار، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

۲- دانشیار، گروه اصلاح نباتات دانشگاه شهرکرد

Ghasemh Mesrami A<sup>1</sup>, Navabpuor S<sup>\*1</sup>, Yamchi A<sup>1</sup>, Hooshmand S<sup>2</sup>

1-MSc, Associate Professor, Assistant Professor, University of Agricultural Sciences and Natural Resources

2- Associate Professor, Department of Plant Breeding, Shahrekord University

\* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: s.navabpour@yahoo.com

(تاریخ دریافت: ۹۳/۱۰/۲۷ - تاریخ پذیرش: ۹۴/۱۱/۱۷)

#### چکیده

به منظور بررسی اثر تیمار شوری بر برخی شاخص‌های بیوشیمیایی در ژنوتیپ‌های گندم، آزمایشی در شرایط کشت هیدروپونیک در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد. فاکتورهای آزمایشی شامل دو سطح شوری (شاهد و هدایت الکتریکی شش دسی‌زیمنس بر مترمربع) و سه ژنوتیپ شامل دو لاین موتانت (T-67-60 و T-65-7-1) و رقم طبری بودند. فعالیت آنزیم لیپوکسیژناز (LOX)، محتوی کلروفیل و شاخص مالون‌دی‌الدهید مورد بررسی قرار گرفت. با اعمال شوری میزان LOX، مالون‌دی‌الدهید و کلروفیل در ژنوتیپ‌های مورد مطالعه اختلاف معنی‌داری نشان داد. بیش‌ترین میزان تغییرات LOX و مالون‌دی‌الدهید، مربوط به رقم طبری و کم‌ترین میزان تغییرات مربوط به لاین T-67-60 بود. با توجه به وجود همبستگی منفی میزان مالون‌دی‌الدهید و LOX با تحمل به شوری و همبستگی مثبت میزان کلروفیل با تحمل به شوری چنین به نظر می‌رسد، تحمل بالاتر لاین موتانت T-67-60 به شوری در مقایسه با ژنوتیپ‌های دیگر توجیه‌پذیر باشد. در واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز با ۱۵ آغازگر ISSR ۱۸۲ باند قابل امتیازدهی تکثیر شد. از ۱۵ آغازگر مورد استفاده در این تحقیق ۱۳ آغازگر الگوی باندهای واضح و تکرار پذیر تولید نمودند که بین آن‌ها شش آغازگر چند شکلی نشان دادند. در این میان، تعداد قطعات تکثیر شده توسط آغازگرهای مختلف متفاوت بود. بیش‌ترین تعداد قطعات تکثیر شده مربوط به آغازگرهای ۱۵ و ۲۲ با تعداد ۲۲ باند و کم‌ترین تعداد قطعه تکثیر شده مربوط به آغازگر ۱۷ با ۱۳ باند بود. تشابه ژنتیکی ژنوتیپ‌های مورد بررسی با استفاده از ضریب تشابه جاکارد از ۰/۹۴ تا ۰/۹۶ متغیر بود. پایین بودن دامنه فاصله ژنتیکی میان ژنوتیپ‌های مورد بررسی نشان دهنده نزدیکی ژنتیکی بالای آن‌ها بوده و بر صحت جد والدی طبیعی دلالت دارد، تنوع موجود در شدت باندها و به‌ویژه مشاهده باندهای جدید موبد بروز جهش در لاین‌های مورد بررسی بود.

#### واژه‌های کلیدی

اشعه گاما

تنوع ژنتیکی

شوری

گندم

لاین‌های موتانت

## مقدمه

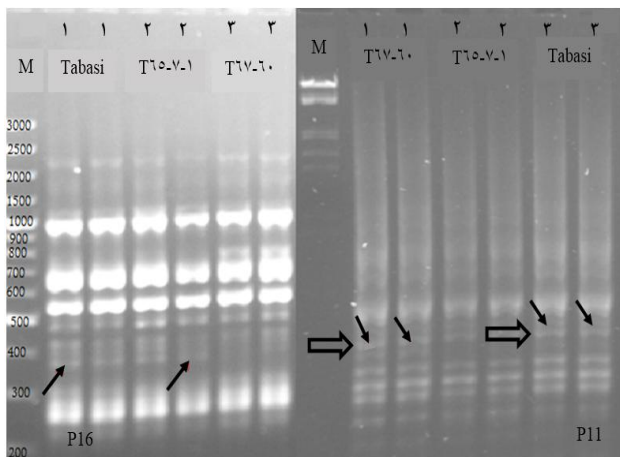
افزایش تنوع ژنتیکی از اهداف اولیه و اساسی در اصلاح نباتات می‌باشد. القای جهش روشی برای افزایش تنوع ژنتیکی است که همراه با انتخاب، نوترکیبی و یا ترکیبی از این دو در اصلاح گیاهان مورد استفاده قرار می‌گیرد. در حقیقت، جهش با ایجاد تنوع زمینه را برای ظهور قابلیت‌های بالقوه ژنتیکی که به‌طور طبیعی بروز نمی‌یابند فراهم می‌سازد. از آن جایی که جهش‌های خود به خودی با فراوانی خیلی کم رخ می‌دهند، روش‌های القای جهش ابزار مناسبی جهت افزایش تنوع در گونه‌های گیاهی می‌باشند. جهش‌های القایی سهم عمده‌ای در شناخت سازوکار ژنتیکی، به ویژه درک ساختار و عملکرد مواد ژنتیکی دارند (Maluszynski et al. 1995). تنوع حاصل از جهش اگر موجب سازگاری شود به حفظ و بقای موجود در محیط‌های مختلف کمک می‌کند. با وجود برخی محدودیت‌ها در اصلاح موتاسیونی، القای جهش به‌طور وسیعی برای اصلاح گیاهان استفاده می‌شود. مزیت مهم اصلاح موتاسیونی پتانسیل اصلاح یک یا چند صفت بدون تغییر منابع ژنی می‌باشد (Wani and Anis 2008). استفاده از تکنیک‌های هسته‌ای برای افزایش تنوع ژنتیکی گیاهان زراعی به‌منظور ارتقای صفات کمی و کیفی آن‌ها از اهمیت خاصی برخوردار است. بسیاری از گیاهانی که از لحاظ خصوصیات اقتصادی بهبود یافته‌اند با استفاده از القای موتاسیون به وجود آمده‌اند. بهترین موتانت‌های شناخته‌شده در زمینه به‌نژادی گیاهان زراعی، موتانت‌های پاکوتاه گندم و برنج است که با کاهش ارتفاع و افزایش عملکرد و کودپذیری بالا منجر به انقلاب سبز در تولید غلات در اواسط دهه ۱۹۶۰ میلادی شدند (IAEA 2009). القای جهش، اصلاح کنندگان را قادر به انتخاب ژنوتیپ‌های جدید با ویژگی‌های مطلوب مانند زودرسی، تحمل به شوری، عملکرد مطلوب و کیفیت بالا می‌سازد (Rahman et al. 1995). در برزیل، استفاده از فناوری پرتوتابی به‌عنوان روشی مناسب در بهبود نارسایی در گندم و افزایش زودرسی در سویا مورد استفاده قرار گرفته است. پرتوهای یون ساز از جمله پرتو گاما، با ورود به داخل بافت و سلول با اتم‌ها و مولکول‌های مختلف واکنش داده و رادیکال‌های آزاد را در سلول‌ها تولید می‌کنند و بسته به شدت پرتو، تغییرات مثبت یا منفی در صفات مورفولوژیک، فرایندهای فیزیولوژیک و

بیوشیمیایی در گیاهان ایجاد می‌شود (Wi et al. 2007). از جهش‌زاهای فیزیکی مانند اشعه گاما و ترکیب آن با جهش‌زاهای شیمیایی مانند اتیل متان سولفانات برای القای تغییرات ژنتیکی و یا القای مقاومت به بیماری‌ها در گیاهان به‌طور موفقیت‌آمیزی استفاده شده‌است (Atak et al. 2004). بیش از ۲۳۰۰ واریته جهش‌یافته با استفاده از پرتوهای جهش‌زا آزاد شده‌است (Jain 2005). بررسی‌های ژنتیکی و مورفولوژیکی نشان داده‌است که این گونه جهش‌ها باعث ایجاد تغییرات قابل توجهی در سطح ماده ژنتیکی و در سطح مورفولوژیکی شده، که این تغییرات می‌تواند در راستای اهدافی باشد که محققان به دنبال آن هستند (Manjaya et al. 2007). پرتو گاما به‌عنوان یک عامل جهش‌زای مؤثر شناخته شده و می‌تواند جهت انجام مطالعات گسترده در سطح ژنومی و تحلیل تغییرات ژن‌های رمزکننده پروتیین‌های مهم استفاده شود. این آزمایش با هدف بررسی تیمار تنش شوری بر برخی ویژگی‌های بیوشیمیایی گندم و بررسی تنوع ژنتیکی ایجاد شده به‌وسیله پرتوتابی گاما در رقم طوسی و لاین‌های پیشرفته جهش‌یافته به کمک نشانگر مولکولی ISSR انجام شد.

## مواد و روش‌ها

در این تحقیق بذور سه ژنوتیپ گندم نان شامل رقم طوسی به عنوان والد و دو لاین جهش‌یافته پیشرفته نسل ششم این رقم با نام‌های T-67-60 و T-65-7-1 از موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج و سازمان انرژی اتمی ایران (پژوهشکده تحقیقات کشاورزی، پزشکی و صنعتی) تهیه شد. کاشت بذرها به دو صورت کشت در محیط هیدروپونیک برای اندازه‌گیری شاخص‌های بیوشیمیایی و کشت در گلدان جهت نمونه‌گیری برای استخراج DNA انجام گرفت. ابتدا برای داشتن گیاهچه‌های عاری از هرگونه آلودگی، بذرها ضدعفونی شدند. سپس بذور روی کاغذ صافی مرطوب درون پتری‌دیش در شرایط تاریک انکوباتور به مدت سه روز در دمای  $24 \pm 1$  درجه سانتی‌گراد کشت شد. آنگاه گیاهچه‌ها به محیط مایع یوشیدا (Yoshida et al. 1976)، منتقل و به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار، تحت شرایط روشنایی (۶ ساعت نوری به شدت ۲۴۰۰ لوکس) و دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به روش

۱۰ دقیقه اعمال شد. تکثیر در ۳۵ چرخه شامل ۹۴ درجه سانتی-گراد به مدت یک دقیقه، دمای اتصال آغازگرها بر اساس جدول ۱ به مدت یک دقیقه و دمای گسترش ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت دو دقیقه صورت گرفت. جهت تکمیل تکثیر، یک مرحله گسترش نهایی با دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه نیز در نظر گرفته شد. پس از اتمام چرخه‌ها محصولات واکنش از دستگاه خارج شده و تا قبل از الکتروفورز در دمای چهار درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. واکنش PCR جهت تعیین تکراریذیری نشانگرهای ISSR دوبار تکرار شد. محصول PCR روی ژل آگارز ۱/۵ درصد TBE و با ولتاژ ثابت ۸۰ ولت در ۸۰ دقیقه الکتروفورز شد. ژل‌ها با سه میکرولیتر اتیدیوم بروماید (۰/۵ میکروگرم برای هر میلی لیتر ژل) رنگ‌آمیزی شد. پس از قرار گرفتن در زیر نور فرابنفش عکس‌برداری از آن‌ها انجام شد (شکل ۱). بعد از تعیین صحت واکنش PCR، نمونه‌ها روی ژل اکریل‌آمید شش درصد الکتروفورز شدند.



شکل ۱- نمونه‌ای از قطعات تکثیرشده توسط آغازگرهای شماره ۱۱ و ۱۶ بر روی ژل آگارز. ۱ و ۲ به ترتیب ژنوتیپ والد طوسی، لاین‌های موتانت T-65-7-1 و T-67-60 حاصل از طوسی. واکنش PCR برای تمام نمونه‌ها در دو تکرار انجام شد.

#### سنجش<sup>۱</sup> TBARM

در این بخش برای سنجش میزان فرآیند سطح اکسیداتیو سلول، میزان مالون دی‌آلدئید (ماده نهایی که در فرآیند اکسیداسیون

هیدروپونیک در گلخانه کشت شدند و تنش شوری  $6 \text{ ds/m}^2 \text{ EC}$  = به‌همراه تیمار شاهد (عدم تنش شوری) اعمال شد. محیط‌های کشت هر هفته تعویض و pH محیط با استفاده از KOH و HCl بین ۵ تا ۵/۵ تنظیم شد. جهت استخراج DNA نیز آزمایشی در هفت گلدان برای هر ژنوتیپ انجام گرفت. در مرحله دو برگ‌ی نمونه‌گیری از ژنوتیپ‌ها در همه گلدان‌ها صورت گرفت و استخراج DNA از مخلوطی از برگ‌ها انجام شد.

جدول ۱- توالی آغازگرهای ISSR مورد استفاده در ژنوتیپ‌های مورد مطالعه (FAO/IAEA 2010)

نام آغازگر	توالی	دمای T <sub>a</sub> مورد استفاده (سانتی‌گراد)
ISSR9	5'-CACACACACACACAGCG-3'	۵۵
ISSR10	5'-CACACACACACACAATC-3'	۵۵
ISSR11	5'-GAGAGAGAGAGAGAC-3'	۵۰
ISSR13	5'-AGAAGAGAGAGAGACTT-3'	۵۰
ISSR15	5'-CACACACACACACAAGT-3'	۵۵
ISSR16	5'-TGTGTGTGTGTGTGTGAGT-3'	۵۴
ISSR17	5'-GGGTGGGGTGGGGT-3'	۵۵
ISSR18	5'-CACACACACACACACAG-3'	۵۲
ISSR20	5'-CCACTCTCTCTCTCTCT-3'	۵۵
ISSR21	5'-GACAGACAGACAGACA-3'	۵۲
ISSR22	5'-GAAGAAGAAGAAGAAGAA-3'	۵۰
ISSR24	5'-TGTGTGTGTGTGTGTGG-3'	۵۵
ISSR27	5'-GTGTGTGTGTGTGTGTG-3'	۵۵

#### استخراج DNA و PCR

تمامی مواد مورد نیاز برای انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمرز از شرکت سیناژن خریداری شد. استخراج DNA بر مبنای روش Doyle and Doyle (1988) صورت گرفت. ۱۵ آغازگر برای این تحقیق انتخاب شد (جدول ۱). واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز (PCR) در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل ۱۲/۷۵ میکرولیتر آب مقطر دو بار تقطیر، ۲/۵ میکرولیتر بافر واکنش ۱۰ برابر، ۰/۵ میکرولیتر مخلوط نوکلئوتیدی ۱۰ میلی‌مولار، ۲/۵ میکرولیتر آغازگر (۱۰ پیکومول)، ۰/۵ میکرولیتر آنزیم تک پلی‌مرز (۵ واحد/میکرولیتر)، ۱/۴ میکرولیتر کلرید منیزیم (۵۰ میلی‌مولار) و ۵ میکرولیتر DNA (۵۰ نانوگرم) انجام شد. در این تحقیق از یک برنامه چرخه حرارتی به‌طور اختصاصی برای آغازگرها استفاده شد. برای مرحله واسرشته‌سازی اولیه دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت

<sup>۱</sup> Thiobarbituric Acid Reactive Material

### نتایج و بحث

بررسی الگوی بانندی محصولات PCR با آغازگرهای ISSR واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز با ۱۵ آغازگر ISSR ۱۸۰ باند قابل امتیازدهی تکثیر نمودند. از ۱۵ آغازگر مورد استفاده در این تحقیق ۱۳ آغازگر الگوی نواری واضح و تکرارپذیر تولید کردند که بین آن‌ها شش آغازگر چند شکلی نشان دادند. در این میان، تعداد قطعات تکثیر شده توسط آغازگرهای مختلف متفاوت بود. بیش‌ترین تعداد قطعات تکثیر شده مربوط به آغازگرهای ۱۵ و ۲۲ با تعداد ۲۲ باند و کم‌ترین قطعه تکثیر شده مربوط به آغازگر ۲۴ با تعداد ۶ باند بود. اندازه قطعات تکثیر شده در تمامی آغازگرها بین ۱۰۰ تا ۳۰۰۰ جفت باز تخمین زده شد. از بین قطعات تکثیر شده، ۱۴ باند چند شکل مشاهده شد که مربوط به آغازگرهای ISSR15 و ISSR11 (شکل ۲)؛ ISSR18 و ISSR16 (شکل ۳) و ISSR13 (شکل ۴) بودند که آغازگر ISSR18 بیش‌ترین میزان چند شکلی (۲۵ درصد) را نشان داد. در ماتریس تشابه بین ژنوتیپ‌های مورد بررسی (جدول ۱)، لاین جهش‌یافته T-67-60 با بیش‌ترین ضریب تشابه (۰/۹۷) نزدیک‌ترین موتانت به والد (رقم طبسی) بود. تشابه ژنتیکی ژنوتیپ‌های مورد بررسی با استفاده از ضریب تشابه جاکارد از ۰/۹۴ تا ۰/۹۶ متغیر بود. پایین بودن دامنه فاصله ژنتیکی میان ژنوتیپ‌های مورد بررسی نشان دهنده نزدیکی ژنتیکی بسیار بالا بین این ژنوتیپ‌ها می‌باشد. با توجه به این که لاین‌های مورد بررسی حاصل از جهش‌زایی با اشعه گاما از یک والد یکسان (رقم طبسی) بودند، بنابراین می‌توان گفت لاین‌های متحمل شامل تغییرات نسبتاً مطلوبی از لحاظ ژنتیکی شدند.

جدول ۲- درجه چند شکلی و اطلاعات مربوط به آغازگرهای استفاده شده در ژنوتیپ‌های بررسی شده

آغازگر	Total Bond	تعداد قطعات چند شکلی	درصد چند شکلی	PIC
ISSR11	۱۸	۲	۱۱	۰/۰۶۶
ISSR13	۱۶	۲	۱۲/۵	۰/۰۶۸
ISSR15	۲۲	۲	۹	۰/۰۵۹
ISSR16	۱۴	۲	۱۴/۵	۰/۰۹۹
ISSR18	۱۶	۴	۲۵	۰/۱۱۷
ISSR27	۲۰	۲	۱۰	۰/۰۶۸

سلولی دارای ثبات بالایی است) مورد اندازه‌گیری قرار گرفت. بدین منظور از روش تغییر یافته Hagege et al. (1990) به شرح زیر استفاده شد. مقدار ۰/۵ گرم برگ تازه، کوبیده و همگن شد و به میزان یک میلی‌لیتر اسید تری‌کلرواستیک ۱۰ درصد به آن افزوده شد. محلول با ۱۰ میلی‌لیتر استون شستشو داده شد و پس از ورتکس به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۴۷۵۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. لکه ایجاد شده با ۵ میلی‌لیتر استون شستشو داده شد و چهار مرتبه دیگر سانتریفیوژ با همان سرعت تکرار شد. سپس مقدار سه میلی‌لیتر اسید فسفریک (یک درصد) و یک میلی‌لیتر اسید تیوباربیوتیک (۰/۶ درصد) افزوده شد و به مدت ۳۰ دقیقه در انکوباتور ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. پس از آن، واکنش با سرد کردن سریع متوقف و به مدت ۲۰ دقیقه با سرعت ۵۵۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ انجام شد. در نهایت میزان جذب در طول موج‌های ۵۳۲ و ۵۹۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر (Uvikon – Kontron) خوانده شد.

سنجش آنزیم لیپوکسی‌ژناز (LOX)

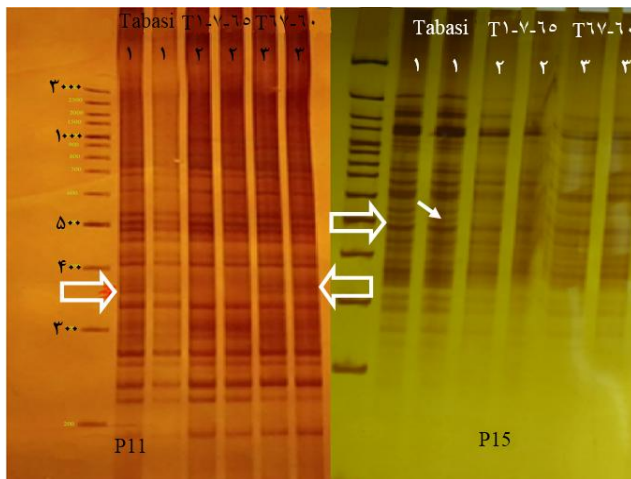
به منظور اندازه‌گیری میزان LOX از روش Zhuang et al. (1994) با اندکی تغییرات استفاده شد. مقدار ۲/۵ گرم نمونه برگ در آب سرد خالص یکنواخت شد. پس از آن با دور  $12000 \times g$  به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. محلول فوقانی حذف و بقیه با کمک ستون ژل PD 10 خالص شد. به مقدار مساوی بافر فسفات پتاسیم (۶/۵۰ mM) اضافه شد. محلول یکنواخت شده با بافر نمک سدیم و اسیدیلنولئیک (۸۰ nmol) همگن شده و با کمک اسپکتروفتومتر (Uvikon – Kontron) در طول موج ۲۳۴ nm قرائت شد.

برای اندازه‌گیری کلروفیل از روش Porra et al. (1989) استفاده شد. مقدار ۰/۵ گرم نمونه برگ کاملاً خرد و با ۱۰ میلی‌لیتر استون ۸۰ درصد به حجم رسانده شد. پس از سانتریفیوژ با دور ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه در مدت زمان ۱۵ دقیقه میزان جذب مایع رویی در طول موج‌های ۶۴۷ و ۶۶۴ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (Uvikon – Kontron) ثبت شد. میزان کلروفیل a (chl a) و کلروفیل b (chl b) بر اساس فرمول‌های زیر محاسبه شدند:

$$\text{Chla (mg/gr)} = 12.25A_{664} - 2.55A_{647}$$

$$\text{Chlb (mg/gr)} = 20.31A_{647} - 4.91A_{664}$$

ملاحظه نشد (شکل ۳). بر اساس شکل ۴ در محصول PCR رقم مادری حاصل از آغازگر ISSR13 بانندی در حدود ۲۰۰۰ جفت‌باز در لاین مادری و لاین جهش یافته T-65-7-1 دیده شد که در لاین جهش یافته T-67-60 مشاهده نشد. همچنین بانندی در حدود ۳۰۰ جفت‌باز به طور انحصاری دیده شد. این باند در لاین جهش یافته T-67-60 و والد طوسی دیده شد که در لاین موتانت T-65-7-1 دیده نشد. تنوع موجود در حذف و اضافه شدن برخی از باندها می‌تواند با میزان جهش DNA در ارتباط باشد که مکان‌های اتصال آغازگرها را تغییر می‌دهد. ظهور باندهای جدید احتمالاً به واسطه تغییرات ساختاری (شکست، جابجایی، حذف) DNA می‌باشد.



شکل ۲- الگوی بانندی تکثیرشده توسط آغازگرهای ۱۱ و ۱۵ بر روی ژل اکریل‌آمید. ۱ و ۲ و ۳ به ترتیب ژنوتیپ والد طوسی، لاین‌های موتانت T-65-7-1 و T-67-60 حاصل از طوسی. واکنش PCR برای تمام نمونه‌ها در دو تکرار انجام شد.

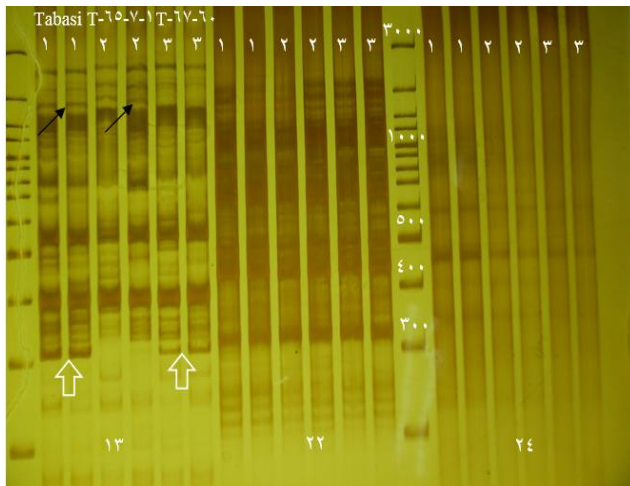
تأثیر شوری بر شاخص‌های بیوشیمیایی

نتایج تجزیه واریانس (جدول ۳) حاکی از معنی‌دار بودن اثر ژنوتیپ، تیمار شوری و اثر متقابل آن‌ها در همه شاخص‌ها بود. معنی‌دار بودن اثر متقابل نشان دهنده واکنش متفاوت ژنوتیپ‌ها به سطح شوری است به همین دلیل برش دهی اثر متقابل انجام شد (جدول ۴). داشت. کاهش مقدار کلروفیل می‌تواند ناشی از تغییر متابولیسم نیتروژن در رابطه با ساخت ترکیباتی نظیر پرولین باشد که در تنظیم اسمزی به کار می‌رود.

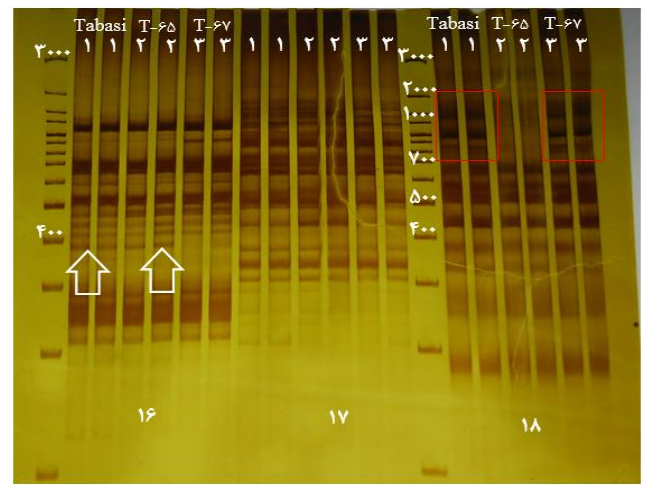
بنابراین نشانگر ISSR توانایی زیادی در کشف تغییرات ژنتیکی ایجاد شده ناشی از اشعه گاما بین لاین‌های موتانت داشته که این نتایج با نتایج مطالعات زیر مطابقت داشت.

در مطالعه‌ای به منظور بررسی تنوع ژنتیکی ۲۶ رقم گندم (۱۵ رقم مقاوم به تنش خشکی و ۱۱ رقم حساس به تنش خشکی) از ۲۱ آغازگر ISSR استفاده شد. از این تعداد آغازگر، ۱۳ آغازگر الگوی بانندی قابل امتیازدهی چند شکل تولید کردند. در این مطالعه ۱۳۳ مکان امتیازدهی شد که از این تعداد، ۹۲ مکان چند شکلی نشان دادند. میانگین محتوای اطلاعات چند شکل (PIC) برای آغازگرها ۰/۳۷ بود. دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای ارقام را به دو گروه اصلی تقسیم‌بندی نمود. نتایج این پروژه نشان داد که نشانگر ISSR به طور موثری می‌تواند برای مطالعه تنوع ژنتیکی ارقام گندم استفاده شود (Roz et al. 2010) بر اساس شکل ۲ در محصول PCR رقم مادری حاصل از آغازگر ISSR15 بانندی در حدود ۵۰۰ جفت‌باز به طور انحصاری دیده شد. این باند در دو لاین جهش یافته T-65-7-1 و T-67-60 دیده نشد. همسانه سازی و تعیین توالی این فرآورده و معرفی آن به عنوان یک نشانگر<sup>۱</sup> SCAR می‌تواند مناسب باشد. این نشانگر را جهت شناسایی رقم والدی از لاین‌های جهش یافته به راحتی می‌توان استفاده کرد. افزون بر این، تعیین توالی و جستجوی مشابهت‌های آن در بانک اطلاعاتی می‌تواند مقدمه‌ای برای بررسی‌های تکمیلی ژنتیک برگشتی و تعیین نقش احتمالی آن باشد. همچنین در محصول PCR حاصل از آغازگر ISSR11 بانندی در بین ۳۰۰ تا ۴۰۰ جفت‌باز در رقم مادری و لاین جهش یافته T-67-60 به طور انحصاری دیده شد که این باند در لاین جهش یافته T-65-7-1 مشاهده نشد (شکل ۲). وجود این باندها توسط الگوی بانندی تکثیرشده با آغازگر ISSR11 بر ژل آگارز تایید شد (شکل ۱). با توجه به الگوی بانندی تکثیرشده توسط آغازگر ۱۶ روی ژل اکریل‌آمید در والد و لاین جهش یافته T-65-7-1 در محدوده ۴۰۰ جفت‌باز بانندی مشاهده شد که در لاین جهش یافته T-67-60 دیده نشد. همچنین در الگوی تکثیری با آغازگر ۱۸ در محدوده ۲۰۰-۷۰۰ جفت‌باز ۴ عدد باند در لاین جهش یافته T-67-60 و والد (طوسی) دیده شد که این باندها در لاین جهش یافته T-65-7-1

<sup>1</sup> Sequence Characterized Amplified Region



شکل ۴- الگوی بانندی تکثیر شده به ترتیب توسط آغازگرهای ۱۳، ۲۲ و ۲۴ بر روی ژل اکریل‌آمید. ۱ و ۲ به ترتیب ژنوتیپ والد طبعی، لاین‌های موتانت T-65-7-1 و T-67-1 حاصل از طبعی. واکنش PCR برای تمام نمونه‌ها در دو تکرار انجام شد.



شکل ۳- الگوی بانندی تکثیر شده به ترتیب توسط آغازگرهای ۱۶، ۱۷ و ۱۸ بر روی ژل اکریل‌آمید. ۱ و ۲ به ترتیب ژنوتیپ والد طبعی، لاین‌های موتانت T-65-7-1 و T-67-1 حاصل از طبعی. واکنش PCR برای تمام نمونه‌ها در دو تکرار انجام شد.

جدول ۳- نتایج تجزیه واریانس داده‌های شاخص‌های بیوشیمیایی در ژنوتیپ‌های گندم به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی

میانگین مربعات				درجه آزادی	منابع تغییر
کلروفیل (b)	کلروفیل (a)	TBARM	LOX		
۷/۶۵۳**	۳۷/۵۶**	۶/۸۷**	۳/۹۵**	۲	ژنوتیپ
۱۰/۱۲۹**	۱۸/۶۰۱**	۲/۸۶**	۴/۲۴**	۱	شوری
۲/۶۰۶**	۵/۹۸۱**	۱/۹۸**	۱۰/۳**	۲	ژنوتیپ×شوری
۰/۰۲۶۶	۰/۰۱۸۹۰	۰/۲۹	۰/۰۶۲	۱۲	خطا

\*\* معنی داری در سطح احتمال یک درصد

جدول ۴- نتایج برش‌دهی اثرات متقابل داده‌های شاخص‌های بیوشیمیایی در ژنوتیپ‌های گندم

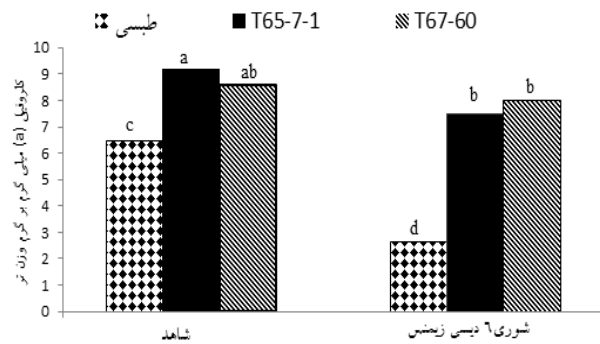
میانگین مربعات								درجه آزادی	منابع تغییر
کلروفیل b		کلروفیل a		TBARM		LOX			
شوری	شاهد	شوری	شاهد	شوری	شاهد	شوری	شاهد		
۱۲**	۰/۲۵ <sup>ns</sup>	۳۶/۶**	۰/۰۸ <sup>ns</sup>	۱/۴۵**	۰/۰۹۱ <sup>ns</sup>	۲۱/۰۵۲**	۳/۵۳**	۲	ژنوتیپ
۰/۱۶	۰/۰۶	۰/۴۱	۰/۰۲۵	۰/۰۳	۰/۰۲۴	۶/۰۷	۰/۱۷	۶	خطا
۱۱/۱	۱۰/۸	۵/۲۱	۸/۶	۶/۷	۸/۵	۱۲/۴	۹/۸	-	%CV

ns و \*\* به ترتیب عدم معنی داری و معنی داری در سطح احتمال یک درصد

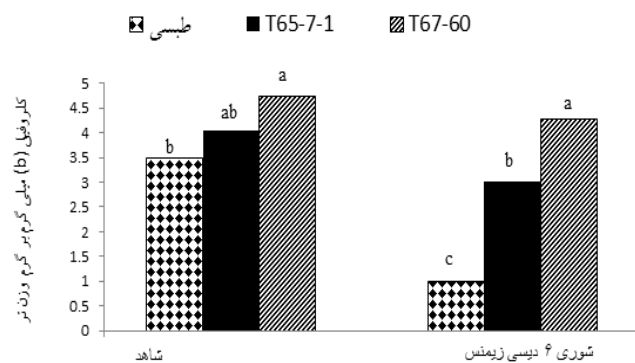
داشت. اختلاف بین تیمار شوری و شاهد معنی‌دار بود. با اعمال تنش شوری میزان کلروفیل (a) و (b) در ژنوتیپ‌های مورد مطالعه روند کاهشی نشان داد. بیش‌ترین تغییرات مربوط به رقم طبعی بود. نتایج این پژوهش با نتایج Moloudi et al. (2013) که بیان داشتند در شرایط تنش شوری کلروفیل کاهش می‌یابد، مطابقت

تأثیر شوری بر میزان کلروفیل با توجه به نتایج به‌دست آمده از تجزیه واریانس (جدول ۳)، اثر شوری و رقم بر میزان کلروفیل (a) و (b) معنی‌دار بود. نتایج مقایسات میانگین نشان داد با افزایش تنش شوری میزان کلروفیل (a) (شکل ۵) و کلروفیل (b) (شکل ۶) در رقم طبعی تفاوت چشمگیری

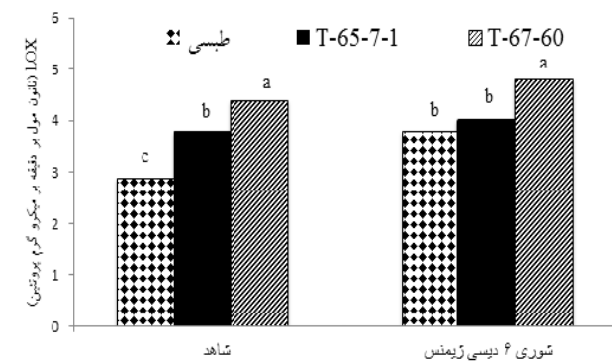
چرب شوند و رادیکال اسید چرب در حضور اکسیژن با تولید پراکسید اسید چرب می‌تواند ضمن تخریب چربی‌ها و پروتئین‌ها رادیکال‌های بیشتری تولید نماید (Bailey 2004).



شکل ۵- تأثیر تنش شوری بر کلروفیل (a). حروف مشابه بیانگر عدم تفاوت معنی‌دار و حروف غیرمشابه بیانگر تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد



شکل ۶- تأثیر تنش شوری بر کلروفیل (b). حروف مشابه بیانگر عدم تفاوت معنی‌دار و حروف غیرمشابه بیانگر تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد



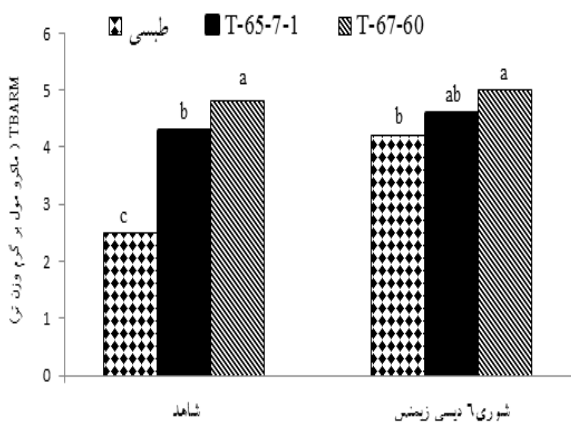
شکل ۷- تأثیر شوری بر میزان LOX. حروف مشابه بیانگر عدم تفاوت معنی‌دار و حروف غیرمشابه بیانگر تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد

افزایش تولید پرولین موجب می‌شود تا گلوتامات که پیش ماده ساخت کلروفیل و پرولین است کم‌تر در مسیر بیوسنتز کلروفیل شرکت داشته باشد (Ghogdi et al. 2013). پایداری کلروفیل شاخصی از مقاومت گیاه به تنش‌های محیطی است. بالا بودن این شاخص نشان دهنده بی‌تأثیر بودن این تنش بر میزان کلروفیل گیاه است. ارقام مقاوم شاخص کلروفیل بالاتری دارند (Amirjani 2010). نتایج این پژوهش با نتایج Ghogdi et al. (2013) و نتایج Chaitali and Sengupta (2014)، مطابقت داشت.

اثر شوری بر سیستم آنزیمی لیپوکسی‌ژناز

یکی از سیستم‌های آنزیمی مهم در رابطه با تغییر چربی‌های غشاهای سلولی، سیستم آنزیمی لیپوکسی‌ژناز (LOX) می‌باشد. این آنزیم واکنش ترکیب بین مولکول اکسیژن و اسیدهای چرب غیراشباع و تولید هیدرو پروکسیدهای اسید چرب اشباع نشده را کنترل می‌کند. اکسیداسیون اسیدهای چرب ناشی از فعالیت این آنزیم موجب تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن می‌شود (Bandyopadhyay et al. 1999). با توجه به نتایج به دست آمده در این مطالعه، اثر شوری بر میزان تجمع LOX معنی‌دار بود (شکل ۷). این موضوع نشان می‌دهد شوری به میزان زیادی میزان LOX را تحت تأثیر قرار داده است. بالا بودن شاخص LOX فراوانی رادیکال‌های فعال اکسیژن و شدت فرآیندهای اکسیداتیو است. به‌طور کلی، تنش موجب افزایش تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن مانند پراکسید هیدروژن در سلول‌های گیاهی می‌شود و به دنبال آن پراکسید هیدروژن به دست آمده، موجب افزایش آنزیم لیپوکسی‌ژناز در سلول‌های گیاهی خواهد شد (Sudhakar et al. 2001). این آنزیم اکسیژناسیون اسیدهای چرب غیراشباع و با زنجیره طولانی حاوی یک پیوند سیس را کاتالیز می‌کند. اسید لینولئیک و اسید لینولئیک بیش‌ترین اسیدهای چرب غیراشباع در ساختمان سلول‌های گیاهی هستند که ماده اولیه ایده‌آلی برای فعالیت این آنزیم می‌باشند (Ghogdi et al. 2013). (Sofa 2004) et al. گزارش نمودند که رادیکال‌های آزاد اکسیژن با اثر بر روی پیوندهای دوگانه اسیدهای چرب غیراشباع در غشا، واکنش‌های زنجیره‌ای پراکسیداسیون را تحریک کرده و منجر به تخریب اسیدهای چرب می‌شوند. رادیکال‌های آزاد می‌توانند با خارج کردن  $H^+$  از فسفولیپیدها موجب تشکیل رادیکال‌های فعال اسید

است که این تنوع مفید و مطلوب بود، به گونه‌ای که لاین‌های جهش یافته از نظر صفات مورد بررسی نسبت به رقم مادری عموماً برتر بودند. مقایسه میانگین‌ها نشان داد که لاین‌های جهش یافته از نظر صفات بیوشیمیایی مورد بررسی (کلروفیل و TBARM و LOX) نسبت به والد خود برتر بودند. وجود لاین-های برتر از نظر این صفات در شرایط شوری، حائز اهمیت است چون ژنتیک این گونه صفات در نسل‌های پیشرفته جهش (M3 یا M4) تثبیت می‌شود. حال آن که نسل بررسی شده حاضر، نسل ششم جهش یافته‌ها (M6) بود.



شکل ۸- اثر تنش شوری میزان TBARM. حروف مشابه بیانگر عدم تفاوت معنی‌دار و حروف غیرمشابه بیانگر تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد

بر اساس این تحقیق مشخص شد که جهش القایی پرتو گاما تاثیر مطلوبی در ایجاد لاین‌های موتانت با خصوصیات مطلوب داشته است. لاین‌های موتانت از نظر صفت اکسیداتیوی TBARM وضعیت بهتر و پایدارتری را در شرایط تنش شوری در مقایسه با ژنوتیپ مادری نشان داد. به نظر می‌رسد این ژنوتیپ‌ها می‌توانند کاندید مناسبی از نظر تحمل به تنش اکسیداتیوی تلقی شوند. هرچند میزان LOX در این ژنوتیپ‌ها به طور نسبی در مقایسه با ژنوتیپ مادری بالاتر بود، اما همچنان از ثبات و پایداری مطلوبی در شرایط تنش شوری برخوردار بود، که این موضوع نشان دهنده انعطاف‌پذیری این لاین نسبت به تیمار شوری بود. وجود اختلاف معنی‌دار برای شاخص‌های اکسیداتیوی (TBARM و LOX) بین ژنوتیپ‌های مورد مطالعه مبین تاثیر پرتوتابی در ایجاد جهش و ایجاد تنوع ژنتیکی از نظر این صفات بود. در این تحقیق تنوع

اثر شوری بر میزان تغییرات صفت بیوشیمیایی TBARM نتایج تجزیه واریانس سنجش TBARM در جدول ۳ نشان داد اثر ژنوتیپ، شوری و اثر متقابل بر میزان تجمع TBARM در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار است. بالا بودن میزان TBARM مبین فراوانی رادیکال‌های فعال اکسیژن و شدت فرآیندهای اکسیداتیو است. اصولاً غلظت‌های زیاد این رادیکال‌ها در اکسیداسیون مولکول‌های حیاتی نظیر پروتئین‌ها، اسیدهای نوکلئیک و چربی‌ها نقش دارند. از نظر میزان تحمل به شوری اختلاف بین ژنوتیپ‌ها معنی‌دار بود. معنی‌دار شدن اختلاف بین ژنوتیپ‌ها در سطوح مختلف شوری و اثر متقابل آن‌ها نشان می‌دهد تیمارهای شوری به میزان قابل توجه صفت اکسیداتیوی TBARM را تحت تاثیر قرار داده است. به طور کلی، روند افزایشی TBARM با افزایش تنش شوری انطباق زیادی نشان داد (شکل ۸). نتایج این مطالعه با نتایج Moloudi et al. (2013) در گندم و Navabpuor (2013) در کلزا که بیان می‌نمایند با افزایش تنش، میزان TBARM افزایش می‌یابد، مطابقت داشت. آزمون مقایسه میانگین برای صفات مورد مطالعه نشان داد که نسل ششم لاین‌های پرتو تابیده دارای ارزش بیشتری از نظر صفات مورد بررسی بودند. این نتایج با بررسی Marofiniya and Ahmadikhah (2012) که بیان نمودند لاین‌های جهش‌یافته برنج باعث توسعه ارقامی می‌شود که الل مطلوبی دارند و می‌توانند برای توسعه بیش‌تر ارقام برنج با عملکرد و اجزای عملکرد مطلوب به کار گرفته شوند مطابقت دارد. همچنین نتایج این پژوهش با نتایج Chaitali and Sengupta (2014) مطابقت داشت. آن‌ها نیز بیان نمودند افزایش شوری باعث افزایش مالون-دی‌الدهید می‌شود. با توجه به این که ژنوتیپ‌های موتانت وضعیت بهتری به لحاظ صفات مورد مطالعه به ویژه تحمل به شوری و مهار میزان تنش اکسیداتیو سلولی داشتند، این امر می‌تواند به دلیل وجود یک تعادل مثبت کربنی در فرآیند فتوسنتز باشد که نتیجه آن راندمان بیشتر تثبیت کربن و عملکرد بالاتر در لاین‌های موتانت متحمل بود.

### نتیجه‌گیری کلی

اختلاف بین لاین‌های جهش یافته و رقم مادری (طبیسی) از نظر صفات مورد بررسی نشان دهنده تنوع بین آن‌ها بود. شایان ذکر



به طور قابل توجهی ژنوتیپ‌های والد و جهش یافته را از همدیگر تشخیص دادند. بنابراین استفاده از این نشانگرها که چند شکلی قابل قبولی را در گندم نشان دادند قابل توصیه است.

### منابع

- Amirjani MR (2010) Effect of NaCl on some physiological parameters of rice. *European Journal of Biology Science* 3: 6-16.
- Atak Ç, Alikemanoglu S, Acik L, Canbolat Y (2004) Induced Of Plastid Mutations In Soybean Plant (*Glycine Max* L Merrill) With Gamma Radiation And Determination With Rapd Mutation Research 556: 35-44.
- Bailly C (2004) Active oxygen species and antioxidants in seed biology. *Seed Science Research* 14: 93-107.
- Bandyopadhyay U, Das D, Banerjee RK (1999) Reactive oxygen species: oxidative damage and pathogenesis. *Current Science* 77: 666-678.
- Chaitali R, Sengupta DN (2014) Effect of short term NaCl stress on cultivars of *s. lycopersicum*: a comparative biochemical approach. *Journal of Stress Physiology and Biochemistry* 1: 59-81.
- Doyle JJ, Doyle JL (1988) Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12: 13-15.
- FAO/IAEA Interregional Training Course on Mutant Germplasm Characterization (2010) 154: 63-65.
- Ghogdi E, Borzouei A, Jamali S, Hashem pour N (2013) Changes in root traits and some physiological characteristics of four wheat genotypes under salt stress. *International Journal of Agriculture and Crop Sciences* 5: 838-844.
- Hagege D, Nouvelot A, Boucard J, Gaspar T (1990) Malondialdehyde titration with thiobarbiturate in plant extracts: avoidance of pigment interference. *Phytochemical Analysis* 1: 86-89.
- IAEA (2009) Induced Mutation In Tropical Fruit Trees. Vienna. Iaea-Tecd-1615. 170 P-11.
- Jain S M (2005) Major mutation-assisted plant breeding programs supported by FAO/IAEA Plant Cell Tiss Org Cult 82: 113-123.
- Moloudi F, Navabpour S, Soltanloo H, Ramazanpour SS, Sadeghipour H (2013) Catalase and metallothionein genes expression analysis in wheat cultivars under drought stress condition. *Journal of Plant Molecular Breeding* 1: 54-68.
- Maluszynski M, Beanet SA, Bojorn S (1995) Application Of In Vitro And In Vivo Mutation Techniques For Crop Improvement. *Euphytica* 85: 303-307.
- Manjaya JG, Suseelan KN, Gopalakrishna T, Pawar SE, Bapat VA (2007) Radiation Induced Variability Of Seed

نشانی از جهش القایی حاصل از پرتو گاما در گندم به کمک نشانگر مولکولی ISSR آشکار و تایید شد. جهش باعث ایجاد تنوع کافی در ژنوتیپ مادری مورد مطالعه شد. به طور کلی در این تحقیق مشخص شد که نشانگرهای مورد استفاده در این آزمایش

- Storage Proteins In Soybean [*Glycine Max* (L ) Merrill] *Food Chemistry* 100: 1324-1327.
- Marofiniya A, Ahmadikhah A (2012) Comparison of morphological and molecular some choice Layn Hay rice mutant maternal lineage (cultivar Neda). thesis submitted in partial fulfillment of the requirements for the degree of M.Sc. in Plant Breeding Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources. IR. (In Farsi)
- Navabpour S (2013) Induced Genes Expression Pattern in Response to Drought Stress in Repeseed (*Brassica napus*). *Seed and Plant Improvement Journal* 29: 535-549. (In Farsi)
- Porra RJ, Thompson WA, Kriedmann PE (1989) Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls a and b extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. *Biochem Biophys Acta* 975: 384-394.
- Rahman SM, Takagi V, Kubota K, Miyamoto K, Kawakita V (1995) High Oleic Acid Mutant In Soybean Induced By X-Ray Irradiation *Biosci Biotech Biochem* 59: 922-933.
- Roz M, Ahmadi G, Garosi GhA, Bigi AH (2010) Evaluation of Genetic Diversity and susceptible cultivars of wheat Bread using the microsatellite markers (ISSR). *Modern genetics* 5:69-76. (In Farsi)
- Sofa A, Dichio B, Xiloyannis C, Masia A (2004) Effects of different irradiance levels on some antioxidant enzymes and on malondialdehyde content during rewatering in olive tree. *Plant Science* 166: 293-300.
- Sudhakar C, Lukshmi A, Giridarakumar C (2001) Changes in antioxidant enzymes efficacy in two high yielding genotypes of mulberry under NaCL salinity. *Plant Science* 161: 613-619.
- Wani A, Anis M (2008) Gamma Ray- And Ems-Induced Bold-Seeded High-Yielding Mutants In Chickpea (*Cicer Arietinum*). *Turkish Journal of Biology* 32: 1-5.
- Wi SG, Chung BY, Kim JS (2007) Effects Of Gamma Irradiation On Morphological Changes And Biological Responses In Plants. *Micron* 38: 553-564.
- Yoshida S, Forno DA, Cock JH, Gomez KA (1976) *Laboratory Manual for Physiological Studies of Rice*. Los Bãos, Filipinas.
- Zhuang H, Barth MM, Hildebrand DF (1994) Packaging influenced total chlorophyll, soluble protein, fatty acid composition and lipoxy genase activity in broccoli florets. *Journal of food Science* 59: 1171-1174.

## Evaluation of genetic diversity in salinity tolerance of wheat mutant lines using ISSR molecular marker

Ghasemh Mesrami A<sup>1</sup>, Navabpuor S<sup>\*1</sup>, Yamchi A<sup>1</sup>, Hooshmand S<sup>2</sup>

1. MSc Graduated, Associate Professor, Assistant Professor, University of Agricultural Sciences and Natural Resources

2. Assistant Professor of Plant Breeding, Shahrekord University

\* Corresponding Author, Email: s.navabpour@yahoo.com

### ABSTRACT

In order to evaluate effect of salt stress treatments on some biochemical traits in wheat genotypes (*Triticum aestivum* L.) an experiment was carried out under hydroponic condition. The experiment was performed as factorial in a completely randomized design with three replications. The treatments were the combination of two salinity levels (0 ds.m<sup>-1</sup> (control) and 6 ds.m<sup>-1</sup>) and three wheat genotypes including, Tabasi cultivar and two mutant lines (T-67-60, T-65-7-1). Lipoxygenase enzyme assay (LOX), chlorophyll content and TBARM amount were measured. LOX, TBARM and chlorophyll levels showed significant differences among studied genotypes under the salinity conditions. Tabasi showed maximum level of LOX and TBARM content while minimum level belonged to T-67-60 line. Regarding to the fact that there is negative correlation between high level of TBARM and LOX amount with salt tolerance as well as positive correlation between high chlorophyll content with salinity tolerance, the most tolerance of T-67-60 mutant line is justified. Polymerase Chain Reaction (PCR) with 15 ISSR primers amplified about 182 bands. Among the 15 primers used in this study, 13 primers generated clear and reproducible banding patterns of which. Among them, six primers showed polymorphism. The number of fragments generated per primer varied from 13 (primer 17) to 22 (primer 15 and primer 22). The size of amplified fragments ranged from 100 to 3000 bp in all the primers. Fourteen polymorphic bands (7.6%) were observed among the amplified fragments, which were related to ISSR15, ISSR11, ISSR18, ISSR16, ISSR13 and ISSR27. ISSR18 showed the maximum (25%) of polymorphism. Genetic similarity between genotypes evaluated by Jaccard similarity coefficient ranged from 0.94 to 0.96. The low genetic distance between genotypes indicated a high degree of similarity between these genotypes. This results implicated that Tabasi is primarily the parent of the mutant lines. Diversity in the bands intensity and presence of some novel bands justified high rate of mutation in studied lines.

### Key Words

Gamma radiation, Genetic diversity, Mutant lines, Salinity, Wheat