مقاله پژوهشی

شناسایی موتانت‌های برنج متحمل به تنش شوری از طریق ارزیابی بیوشیمیائی، عملکردی و مولکولی (cgSSR)

مرتضی اولادی قادیکلائی[۱]، قربانعلی نعمت زاه قراخیل[۱*]، غلامعلی رنجبر[۲]، سیدحمیدرضا هاشمی پطرودی[۳]

[۱]**گروه اصلاح نباتات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، پژوهشکده ژنتیک و زیست فناوری کشاورزی طبرستان، ایران،** [۲] گروه اصلاح نباتات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ایران، [۳]**گروه مهندسی ژنتیک و بیولوژی، پژوهشکده ژنتیک و زیست فناوری کشاورزی طبرستان، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ایران**

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۸/۰۶، تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹۹/۱۲/۰۵)

چکیده

جهت شناسایی لاین‌های موتانت نسل نهم برنج متحمل به شوری، ارزیابی برخی صفات بیوشیمیائی مؤثر در شوری (مرحله گیاهچه‌ای) بصورت آزمایش کرت‌های خرد شده فاکتوریل بر پایه طرح بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار در گلخانه پژوهشکده ژنتیک و زیست فناوری کشاورزی طبرستان، در سال ۱۳۹۸ صورت گرفت. فاکتور اصلی شامل زمان نمونه‌برداری (سه، شش و نه روز پس از اعمال تنش شوری) و فاکتورهای فرعی شامل تنش شوری کلرید سدیم در سه سطح صفر، **٤dS/m** و **٨dS/m** (اضافه نمودن نمک به آب مقطر و خاک معمولی شالیزار و تهیه عصاره اشباع شوری) و ژنوتیپ (١٤ موتانت (**M9**)، دو شاهد حساس سپیدرود و **IR29** و دو شاهد متحمل دیلمانی و **Nonabokra**) بودند. همچنین شناسایی برخی ژن‌های موثر در تنش شوری با استفاده از سه پرایمر ریزماهواره **cgSSR** انجام و در ادامه صفات وزن کل دانه در هر بوته و شاخص تحمل بصورت فاکتوریل ارزیابی گردیدند. نتایج تجزیه واریانس نشان داد اثرات اصلی و اثرات متقابل همه تیمارها در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود. در زمان نمونه‌برداری (۹ روز پس از اعمال تنش) و شوری **٨dS/m**، غلظت پرولین در ژنوتیپ‌های متحمل افزایش و میزان مالون‌دی‌آلدهید کاهش یافت. تجزیه کلاستر (در زمان نه روز پس از تنش و شوری **٨dS/m**) ژنوتیپ‌ها را به پنج گروه تقسیم و چهار ژنوتیپ به همراه شاهد متحمل **G17** در گروه پنجم قرار گرفتند. بررسی مولکولی الگوی باندی پرایمرهای ***OsPEX11-1***، ***OsNac5*** و ***OsRacB(T)*** به ترتیب تعداد شش، دو و هفت ژنوتیپ را همردیف با ژنوتیپ‌های متحمل نشان داد. چهار ژنوتیپ در شوری**٨dS/m**، وزن کل دانه در هر بوته بیشتری نسبت به دیلمانی داشتند. در نهایت با در نظر گرفتن سازوکارهای بیوشیمیائی مؤثر و نتایج تجزیه کلاستر و با تاکید بر ارزیابی مولکولی و عملکردی می‌توان پیشنهاد نمود ژنوتیپ‌های **G1** از موتانت سنگ‌طارم، **G2** از موتانت رشتی، **G4** از موتانت هاشمی و **G9** از موتانت چالوسی در اولویت اول و ژنوتیپ‌های **G8** از موتانت هاشمی، **G12** و **G13** از موتانت نعمت در اولویت دوم به عنوان لاین‌های امیدبخش موتانت متحمل به تنش شوری در مزارعی که با تنش شوری (آب وخاک) مواجه هستند استفاده گردد.

کلمات کلیدی: بیوشیمیائی، تنش شوری، تجزیه کلاستر، موتانت و نشانگر مولکولی.

مقدمه

شوری امنیت و پایداری تولیدات کشاورزی را به مخاطره می‌اندازد (Wu *et al.*, 2015). حدود ۹۳۲ میلیون هکتار از زمین‌های سراسر جهان متأثر از شوری و اسیدیته خاک

[*]نویسنده مسؤل، نشانی پست الکترونیکی: gh.nematzadeh@sanru.ac.ir

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-20]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1400.10.42.26.8]

می‌باشند (Surekha *et al.*, 2008). هم اکنون نیمی از اراضی قابل کشت ایران (۹/۵ میلیون هکتار) متاثر از شوری است که اثر عمده‌ای در کاهش سطح زیر کشت و عملکرد محصولات زراعی دارند (Nabiollahi *et al*, 2017). بر اساس آمار ارائه شده توسط یونسکو، ایران از لحاظ دارا بودن اراضی شور در سطح جهان مقام پنجم را دارد و بین ۲۰۰ تا ۳۰۰ هزار هکتار از اراضی برنج‌کاری گیلان، مازندران و گلستان با شوری تهدید می‌شود (میردار منصوری و همکاران، ۱۳۹۱). تنش‌های محیطی حدود ۷۱ درصد عملکرد گیاهان زراعی را کاهش داده و طبق برآورد کاهش عملکرد در اثر دمای بالا ۱۵ درصد، دمای پایین ٤٠ درصد، تنش خشکی ۱۷ درصد، تنش شوری ۲۰ درصد و ۸ درصد مربوط به سایر تنش‌ها می‌باشد (Ashraf, 2009). غلظت بالای نمک در محلول خاک، باعث افت عملکرد گیاهان زراعی می‌شود (رنجبر و بناکار، ۱۳۸٦ ; Pirasteh-Anosheh *et al.*, 2015). به همین دلیل تولید گیاهان متحمل به شوری یکی از اساسی‌ترین راهکارها برای تأمین غذای بشر به شمار میرود (Kumae *et al*., 2003). القای جهش بوسیله موتاژن‌ها یکی از راه‌های ایجاد تنوع ژنتیکی است. از آنجا که تنوع در سطح گونه‌های گیاهی به‌دلیل تشدید فعالیت‌های اصلاحی به سطح پایینی رسیده است بنابراین موتاسیون به عنوان فرایند افزایش تنوع ژنتیکی شناخته می‌شود (اولادی و همکاران، ۱۳۹٤). موتاسیون یکی از روش‌های اصلاحی بوده که برای بهبود بسیاری از صفات مهم زراعی، از تحمل به تنش‌های غیر زنده (مانند شوری، سرما، اسیدی...) تا مقاومت به بیماری، کیفیت و بازارپسندی به‌کار می‌رود (Okamura *et al*, 2012).

پاسخ گیاهان به تنش شوری همواره یکی از موضوعات مهّم مطالعات فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی، مولکولی، مهندسی ژنتیک و اصلاح نباتات می‌باشد (Kawaura *et al*., 2008). برنج از جمله غلات مهم و تا حدودی حساس به تنش شوری در مرحله گیاهچه‌ای و اوایل زایشی می‌باشد (Mekawy *et al*., 2015). این گیاه در مرحله جوانه‌زنی نسبتاً متحمل و گیاهچه‌ای حساس و در مرحله رشد رویشی (پنجه‌زنی) تا حدودی به شوری متحمل می‌گردد (Moradi, 2002). Kazemi و همکاران (2016) در ارزیابی موفولوژیکی ۲۷ ژنوتیپ برنج محلی شمال و اصلاحی شمال و مرکزی ایران نسبت به تنش شوری ناشی از کلرید سدیم به صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح پایه کاملا تصادفی در دو سطح صفر و ۱۰۰ میلی مولار در سه تکرار بیان نمودند ارقام دیلمانی، ندا و جوزدان بیشترین تحمل و ژنوتیپهای دمسرخ، شیرودی و زایندهرود کمترین تحمل به شوری ناشی از ۱۰۰ میلی مولار کلرید سدیم را نشان دادند. صادقی و همکاران (۱۳۹۷) به منظور ارزیابی واکنش لاین‌های موتانت به تنش شوری در مرحله گیاهچه‌ای، بذور برنج رقم طارم محلی را تحت دو تیمار موتاژن شیمیایی اتیل متان سولفونات و تیمار ترکیبی متیل نیتروز اوره همراه با سدیم آزاید قرار دادند و در نهایت دو لاین موتانت برنج به همراه رقم نونا بوکرا در گروه متحمل قرار گرفتند در این تحقیق از رقم IR29 به عنوان شاهد حساس استفاده گردید. در ارزیابی تحمل به شوری ٤٥ رقم بومی ایرانی، ۲۵ رقم اصلاح شده و ۵ رقم خارجی در مرحله گیاهچه‌ای به صورت آزمایش فاکتوربل در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی در سه تکرار در شرایط کنترل شده و تنش شوری (۱۰/۲ ٤ و ۸ دسی زیمنس بر متر) ارقام خزر، سپیدرود، IR28 و IR29 بسیار حساس به شوری بودند (صبوری و همکاران، ۱۳۸۷). قدیرنژاد شیاده و همکاران (۱۳۹۹) با ارزیابی فیزیولوژیکی و بیوشیمیائی پنج لاین موتانت نسل ششم برنج حاصل از پرتودهی اشعه گاما با دز ۲۵۰ گری تحت تنش شوری کلرید سدیم انجام شد، لاین موتانت نعمت را به عنوان متحمل‌ترین لاین شوری معرفی نمودند.

کاهش عملکرد در شرایط تنش شوری از طریق اختلال در فرآیندهای سلولی و فیزیولوژیک مانند (فتوسنتز، جذب مواد غذایی، جذب آب، رشد ریشه و متابولیسم سلولی) بوجود می‌آید (Pardo, 2010). افزایش فعالیت آنزیم‌های جذب‌کننده انواع اکسیژن فعال یکی از متداول‌ترین مکانیسم‌های تحمل به شوری است (شکرپور و اسفندیاری، ۱۳۹۳). کاهش پتانسیل اسمزی در گیاه تحت تنش شوری نتیجه تجمع برخی از

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-20]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1400.10.42.26.8]

یون‌های محلول (K، Na و Cl) و یا تنظیم‌کننده‌های اسمزی مانند کربوهیدرت‌ها و آمینواسیدهای آزاد (پرولین، گلایسین، بتائین و...) می‌باشد (Khosh-Kholgh Sima *et al.*, 2009; Pessarakli *et al.*, 2009). در ارزیابی بیوشیمیائی که روی سه رقم سنگ‌طارم (متحمل به شوری)، جلودار (نسبتاً حساس به شوری) و IR29 (حساس به شوری) در محیط کشت هیدروپونیک با اعمال تیمار شوری ۱۲۰ میلی‌مولار نمک کلرید سدیم و در شش سری زمانی از بافت‌های برگ و ریشه نمونه‌برداری صورت گرفت، میزان پرولین در ژنوتیپ سنگ‌طارم به‌عنوان یک ژنوتیپ متحمل به شوری در زمان‌های (۷۲، ۱۲۰و ۱٦۸ساعت) نسبت به شاهد حساس افزایش معنی‌داری نشان داد (موسوی زاده و همکاران، ۱۳۹۷). تأثیر تنش شوری روی پارامترهای فیزیولوژیکی در ۱۰٦ ژنوتیپ برنج نشان داد پرولین می‌تواند به‌عنوان یک شاخص مناسب جهت شناسایی ارقام حساس از متحمل به شوری به کار گرفته شود (Kanawapee *et al.*, 2012). در تحقیقی افزایش غلظت مالون‌دی‌آلدهید (Malondialdehyde) برگ تحت تأثیر تنش شوری در گیاهچه‌های سه رقم برنج مطالعه شده و نشان داد که میزان کاهش یا افزایش غلظت آن می‌تواند به‌عنوان یک معیار مناسب برای آنالیز واکنش گیاه برنج به تنش شوری به کار گرفته شود (Bhattacharjee and Mukherjee, 2002). Bandeoglu و همکاران (۲۰۰٤) اظهار داشتند تخریب غشاهای سلولی تحت تأثیر تنش شوری و تولید MDA برگ، ناشی از تخریب و تجزیه چربی‌های غشای سلولی می‌باشد (Bandeoglu *et al.*, 2004).

تحمل به شوری از جمله ویژگی‌های ژنتیکی پیچیده است که توسط تعداد زیادی از ژن‌ها کنترل می‌گردد (Parida Das, 2004 and). Cui و همکاران (۲۰۱٦) بیان نمودند که، *OsPEX11* ژن حیاتی است که در تنظیم Na^+ وK^+ نقش داشته و با تنظیم میزان بیان انتقال دهنده‌های کاتیونی و آنزیم‌های آنتی اکسیدانی، نقشی اساسی در تحمل به تنش شوری دارد بدین صورت که بیان ژن مذکور باعث کاهش سطح پراکسیداسیون چربی (با اندازه‌گیری میزان MDA)، کاهش سرعت انتقال Na^+ وK^+ و افزایش بیان آنزیم‌های آنتی اکسیدانی (پراکسیداز، سوپراکسیددسموتاز، کاتالاز) و تجمع پرولین در سلول گیاهی می‌شود. بنابراین، *OsPEX11* می‌تواند در اصلاح ارقام برای بهبود تحمل به تنش شوری در گیاه برنج در نظر گرفته شود. Takasaki و همکاران (۲۰۱۰) بیان کردند که ژن‌های *OsNAC5* و *OsNAC6* به عنوان فعال‌کننده پروموتر ژن *OsLEA3* هستند که افزایش بیان ژن *OsLEA3* باعث تولید پروتئین‌هایی در بخش رویشی گیاه برنج شده و در نهایت باعث تحمل گیاه نسبت به تنش شوری و کم آبی می‌شود. Luo و همکاران (۲۰۰٦) با انتقال ژن *OsRacB* به گیاه برنج و تنباکو همراه با ایجاد تیمار تنش شوری دریافتند که بیان این ژن ابتدا در قسمت ریشه و سپس بلافاصله در قسمت ساقه و برگ افزایش یافته و با بررسی دقیق‌تر عملکرد این ژن بیان کردند که سالیسیلیک اسید به عنوان فعال‌کننده این ژن بوده و باعث افزایش بیان این ژن می‌شود در حالی که آبسیزیک اسید روی فعالیت این ژن اثری ندارد و در نهایت ژن مذکور به عنوان یکی از فاکتورهای مهم در تحمل به تنش شوری به شمار می‌رود.

در مطالعه‌ای جهت شناسایی لاین‌های موتانت برنج متحمل به شوری با استفاده از جهش اتیل‌متان‌سولفانات (Ethyl methane sulfonate) روی رقم ندا و ارزیابی نسل M2، ۹ لاین متحمل به شوری شناسایی و در ادامه با اعمال شوری در مزرعه با شوری ۷ dS/m کلرید سدیم مورد ارزیابی قرار گرفتند، با توجه به میزان شاخص تحمل به تنش (STI) سه لاین MT196، MT189 و MT41 به‌ترتیب با ۷۷/۹ ، ٦٦/۷ و ٦٦/۲ درصد دارای بالاترین سطح تحمل به تنش شوری و از نظر افت عملکرد در شرایط شوری، سه لاین موتانت MT196، MT189 و MT184 به‌ترتیب با ٤۰/۵، ٤۱/۲ و ٤۲/٤ درصد کمترین میزان افت عملکرد را دارا بوده و به‌عنوان لاین‌های متحمل به شوری شناسایی شدند (احمدی‌خواه و همکاران، ۱۳۹۳).

هدف از این تحقیق شناسایی لاین‌های موتانت متحمل به شوری با ارزیابی برخی صفات بیوشیمیائی در سری زمانی متفاوت در لاین‌های موتانت (M9) برنج تحت تنش شوری

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.23222727.1400.10.42.26.8]

کلرید سدیم و شناخت بهتر سازوکارهای تحمل به تنش و همچنین ردیابی برخی ژن‌های موتر در تحمل به تنش از طریق نشانگرهای مولکولی cgSSR و بررسی شاخص تحمل به تنش (Salt-tolerance index) به همراه وزن کل دانه در هر بوته (در مرحله رسیدگی) می‌باشد.

مواد و روش‌ها

بررسی‌های بیوشیمیائی: جهت ارزیابی صفات بیوشیمیائی موثر در تنش شوری نظیر مالون‌دی‌آلدهید، پرولین و درصد نشت الکترولیت‌ها و شناخت سازوکارهای آن، در سری زمانی متفاوت در لاین‌های موتانت نسل نهم برنج (مرحله گیاهچه‌ای) تحت تنش شوری، یک آزمایش کرت خرد شده فاکتوریل در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار در گلخانه پژوهشکده ژنتیک و زیست فناوری کشاورزی طبرستان، سال ۱۳۹۸ اجراء شد. زمان‌های نمونه‌برداری در سه سری زمانی ۳، ٦ و ۹ روز پس از اعمال تنش به‌عنوان فاکتور اصلی و تنش شوری در سه سطح **صفر**، ٤dS/m **و** ۸dS/m کلرید سدیم (اضافه نمودن نمک به آب مقطر و خاک معمولی شالیزار – خاک معمولی شالیزار حدود ۱/۲ dS/m می‌باشد – و در ادامه تهیه عصاره اشباع شوری) به همراه ژنوتیپ (١٤ لاین موتانت (M9) برنج، دو شاهد حساس سپیدرود و IR29 و دو شاهد متحمل دیلمانی و Nonabokra) (جدول ۱) به‌عنوان فاکتورهای فرعی انتخاب شدند. نمونه‌های برگی در سری‌های زمانی پس از اعمال تنش شوری گرفته شد. در این آزمایش از ١٦٢ گلدان پلاستیکی به عمق ۳۵ و قطر ٤٠ سانتی‌متر استفاده شد که تا عمق ۳۰ سانتی‌متری با خاک معمولی شالیزار، پر شدند. نشاها به تعداد سه بوته بصورت مثلثی به فاصله حدود ۲۵ سانتی‌متر از همدیگر کشت گردیدند. انتقال نشاها به گلدان در مرحلهٔ سه برگی و اعمال تنش شوری بصورت آبیاری با آب مقطر بعلاوه نمک به خاک معمولی شالیزار (که برای هر سطح شوری با اندازه‌گیری عصاره اشباع خاک میزان نمک مورد نیاز مشخص شده بود) در مرحله چهار الی پنج برگی و یک هفته پس از استقرار بوته‌ها در گلدان صورت گرفت.

لاین‌های موتانت نسل نهم مورد مطالعه در این تحقیق حاصل از پرتودهی اشعه گاما از چشمه کبالت ٦٠ و دز ۲۰۰ گری روی ارقام بومی برنج (سنگ‌طارم، رشتی، هاشمی، چالوسی و دمسیاه) و اصلاح شده (نعمت و خزر) می‌باشند که توسط نورالهی و همکاران (۱۳۹۷) با ارزیابی مقدماتی ۲۷۵ لاین موتانت (نسلM7) در تیمار شوری ٦dS/m به عنوان لاین‌های نسبتا متحمل برگزیده شدند.

سنجش میزان مالون‌دی‌آلدهید به روش Heath و Packer (1968) طبق رابطه ۲ انجام شد. ۰/۲ گرم بافت تر برگی در تری‌کلرواستیک اسید 20% (TCA) که حاوی ۰/۵ درصد تیوباربیتوریک اسید (TBA) است همگن شده و به مدت ۳۰ دقیقه در حمام آب گرم (۹۵ درجه سانتی‌گراد) در لوله آزمایش ml ۳۰ حرارت دید. سپس مخلوط حاصله بلافاصله در یخ، سرد شده و در سرعت g ۱۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید. میزان جذب مایع رویی در دو طول موج ۵۳۲ نانومتر و ٦٠٠ نانومتر قرائت گردید. و بر اساس واحد میکرومول بر گرم وزن تر بیان شد.

$$\text{MDA (µM. g-1 fresh wt.)} = [(E_{532}-E_{600}) \times 155] \times 5 \quad \text{(رابطه ۲)}$$

×غلظت مالون‌دی‌آلدهید

اندازه‌گیری پرولین به روش Bates و همکاران (1973) طبق رابطه ۳ انجام شد. ابتدا ۰/۱ گرم بافت تر برگی در۱۰ میلی‌لیتر سولفوسالیسیلیک اسید سه درصد اضافه نموده و ترکیب حاصله در g۱۵۰۰۰ سانتریفوژ تا با تشکیل دو فاز مایع و جامد مواد اضافی از محلول جدا گردد. به میزان یک میلی‌لیتر عصاره صاف شده را با دو میلی‌لیتر اسید نین‌هیدرین به همراه یک میلی‌لیتر اسید استیک گلاسیال مخلوط نموده و در۱۰۰ درجه سانتی‌گراد به مدت یک ساعت حرارت داده و سپس درون یخ قرار داده شد. مقدار دو میلی‌لیتر تولوئن به محلول اضافه و آن را به مدت ۲۰ ثانیه ورتکس نموده در ادامه از دو فاز تشکیل شده فاز روئی را برداشته و در طول موج ۵۲۰ نانومتر با کمک دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت شد در ادامه غلظت پرولین به‌صورت میکرومول بر گرم وزن تر ارائه شد.

$$\text{پرولین (µM. g-1 fresh wt.)} = \frac{M \times T \times W}{115.5} \times 1000 \quad \text{(رابطه ۳)}$$

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-20]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1400.10.42.26.8]

جدول ۱- کد ژنوتیپ و لاین برای ۱٤ لاین موتانت مورد مطالعه به همراه شاهدهای حساس و متحمل

کد ژنوتیپ	نسل	کد لاین	کد ژنوتیپ	نسل	کد لاین و نام رقم
G1	M9	P۱-۷-۲-۱	G10	M9	P٦-۱۳-۲-۱
G2	M9	P۲-۱-۳-۱	G11	M9	P۸-۷-۲-۱-۱۰-۱
G3	M9	P۳-٤-۵-۱	G12	M9	P۱۰-۵-٤-٦-۱
G4	M9	P۳-٤-۵-۳	G13	M9	P۱۰-۵-٤-٦-۱
G5	M9	P۳-٤-۷-۱	G14	M9	P۱۸-۷-۲-۱
G6	M9	P۳-٤-۷-۲	G15	شاهد حساس خارجی	IR29
G7	M9	P۳-٤-۷-۳	G16	شاهد حساس داخلی	Sepidrood (سپیدرود)
G8	M9	P۳-۲۱-۱-۱	G17	شاهد متحمل داخلی	Deilamani (دیلمانی)
G9	M9	P٦-۷-۱-۱	G18	شاهد متحمل داخلی	Nonabokra

G1-18: ژنوتیپ ۱ الی ۱۸، M9 : موتانت نسل نهم، P۱ : سنگ طارم، P۲: رشتی،P۳: هاشمی، P٦ : چالوسی، P۸: دمسیاه P۱۰: نعمت،P۱۸ : خزر

جدول۲- نشانگر cgSSR متحمل به تنش شوری در برنج مورد استفاده در این تحقیق (Kutubuddin *et al*, 2015)

نام ژن		توالی آغازگر	دمای ذوب Tm(°C)	طول قطعه تکثیر شده	مکان کروموزوم
OsNac5	F	ATGTGATTAGAGTCGCTTTCAGTTGG	٥٦/٩	۲۳۸	۱۱
	R	CCAGCTTGTACTTGTGCCAGCC	٥٨/٤		
OsRacB(T)	F	CAAGACCTGCATGCTCATCTCC	٥٦/۱	۲۰۲	۲
	R	CCAGATCAAGAACCATAATCCTAGCTC	٥٦/٩		
OsPEX11-1	F	GCTGCTCTCGACTTTCTTGTTCC	٥٦/۲	۲۷٦	۳
	R	ACTAGCCCTGCACAGACTGAAGAG	٥٥/۸		

M = عدد قرائت‌شده با دستگاه اسپکتروفتومتر، T = حجم تولوئن مورد استفاده (در اینجا ۲ میلی‌لیتر است) و W = وزن نمونه برگی مورد استفاده (برای نمونه هادی ما برابر ۰/۱ است).

درصد نشت الکترولیت‌ها از روش Farooq و Azam(2006) بر اساس رابطه ٤ محاسبه شد. ابتدا با پانچ نمونه برگ (۱۰ قطعه دیسک برگی) تهیه و داخل فالکون ۵۰ML گذاشته و درون شیشه ۱۵ سی‌سی آب مقطر ریخته و ECمحلول بعد از یک شبانه روز اندازه‌گیری سپس نمونه به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۱۲۰ درجه سانتی‌گراد اتوکلاو شده و پس از رسیدن به دمای ۲۵ درجه دوباره EC محلول اندازه‌گیری شد. EC1 و EC2 به‌ترتیب قابلیت هدایت الکتریکی قبل و بعد از اتوکلاو می‌باشد.

(رابطه ٤)100× (EC1 / EC2) = درصد نشت الکترولیت‌ها

گروه بندی لاین‌های موتانت مورد مطالعه از نظر صفات بیوشیمیایی با استفاده از تجزیه کلاستر به روش وارد (Ward) از طریق نرم افزار SPSS ver16 انجام شد.

بررسی‌های مولکولی: ارزیابی مولکولی جهت شناسایی لاین‌های متحمل به شوری با توجه به تحقیق Kutubuddin و همکاران (۲۰۱۵) تعداد سه پرایمر (Novel salt responsive candidate gene based SSRs (cgSSRs)) مرتبط با تنش شوری با نام‌های *OsNac5*، *OsRacB(T)* و *OsPEX11-1* انتخاب و سنتز (Metabion, Germany) گردید (جدول۲).

جهت آنالیز مولکولی ابتدا نمونه‌های برگی لاین‌های

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.23222727.1400.10.42.26.8]

موتانت مورد مطالعه به همراه ارقام شاهد حساس و متحمل در مرحله گیاهچه‌ای برداشت و استخراج DNA به روش CTAB (Doyle J, 1987) انجام شد. محاسبه غلظت DNA با استفاده از میزان جذب UV با دستگاه اسپکتروفتومتری (Beckman coulter, USA, DU®530) در طول موج ۲۶۰ تا ۲۸۰ نانومتر محاسبه و کمیت و کیفیت DNA ژنومی با روش الکتروفورز ژل آگارز تعیین و تکثیر DNA با استفاده از دستگاه PCR (مدل Bio-Rad) انجام گردید. غلظت نهایی مخلوط واکنش برای آغازگر SSR (جهت یک واکنش ۱۲ µl) حاوی ٤/٤ µl آب دوبار تقطیر (ddH2O)، ٦ µl MasterMix، ۰/٦ µl SSR Primer و یک میکرولیتر DNA الگو بوده است. برای هر ترکیب آغازگر واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز شامل این مراحل بود: مرحله اول چهار دقیقه در دمای ۹٤ درجه سانتی‌گراد، مرحله دوم ۳۲ چرخه شامل یک دقیقه در ۹٤ درجه سانتی‌گراد، ۵۰ ثانیه در دمای ۵۷ درجه سانتی‌گراد و ۵۵ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد و در نهایت مرحله سوم با هفت دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد. در ادامه محصول PCR بر روی ژل آگارز ۲/۵ درصد با ولتاژ ٦۰ ولت الکتروفورز با محلول اتیدیوم بروماید در زیر نور ماوراء بنفش رنگ‌آمیزی و رویت گردید.

بررسی‌های عملکردی: جهت اندازه‌گیری صفت وزن کل دانه در هر بوته (گرم)، شاخص تحمل و میزان افت عملکرد، اعمال تنش شوری در اوایل مرحله زایشی گیاه به مدت ۲۰ روز (طبق روش مرحله رویشی) انجام گردید. تجزیه و تحلیل صفت وزن کل دانه در هر بوته بر اساس آزمایش فاکتوریل در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی صورت گرفت. در ضمن نمونه‌های برگی در مراحل قبل طوری برداشت شدند که منجر به حذف بوته‌ها نگردد. شاخص تحمل به تنش (STI) جهت ارزیابی واکنش تحمل ژنوتیپ‌ها به تنش شوری از طریق رابطه ۵ محاسبه شد (Fernandez, 1992).

(رابطه۵) $STI = \frac{YP*YS}{(YP)2}$ شاخص تحمل به شوری

جهت نرمال نمودن داده‌های مربوط به درصد نشت الکترولیت‌ها از تبدیل واحد جذری، تجزیه و تحلیل داده‌های حاصل از آزمایش با استفاده از نرم‌افزار SPSS ver. 16، جهت مقایسات میانگین از آزمون دانکن و جهت رسم نمودارها از نرم‌افزار اکسل 2013 استفاده گردید.

نتایج و بحث

بررسی‌های بیوشیمیائی: نتایج تجزیه واریانس (جدول۳) نشان داد که اثرات اصلی و اثر متقابل تیمارهای زمان در شوری، زمان در ژنوتیپ، شوری در ژنوتیپ و همچنین زمان در شوری در ژنوتیپ برای صفات مالون دی‌آلدهید، پرولین و همچنین نشت الکترولیت در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار شدند.

بررسی برهمکنش ژنوتیپ در شوری برای غلظت مالون‌دی‌آلدهید سه روز پس از اعمال تنش شوری حاکیست اکثر ژنوتیپ‌ها (بجز دو ژنوتیپ G1 و G13) در سطح شوری ٤dS/m روند افزایشی داشتند و ژنوتیپ G8 دارای بیشترین غلظت (۲۷٤/۸ میکرومول بر گرم) بوده و در بالاترین سطح شوری ژنوتیپ‌های G4 ، G7 ، G8، G10 (بیشترین میزان) و G12 به همراه شاهد متحمل G17 روند کاهشی معنی‌داری نشان دادند و ژنوتیپ G12 دارای کمترین میزان غلظت (٤۰/۲۵ میکرومول بر گرم) بوده است (شکل۱).

مقایسه میانگین برهمکنش ژنوتیپ در شوری در زمان سه روز پس از تنش شوری، برای غلظت پرولین در شکل ۲ آمده است. غلظت پرولین در شوری ۸dS/m در ژنوتیپ‌های G9، G10 و G11 افزایش قابل قبولی داشتند بطوریکه ژنوتیپ G11 دارای بیشترین مقدار پرولین به میزان ۳/۳ میکرومول بر گرم بوده و در همین سطح شوری ژنوتیپ G8 کمترین مقدار (۰/۵۷ میکرومول بر گرم) را نشان داد.

برهمکنش ژنوتیپ در شوری برای درصد نشت الکترولیت‌ها در زمان سه روز پس از تنش شوری (شکل ۳) نشان می‌دهد، در شرائط ابتدایی تنش درصد نشت الکترولیت‌ها کاهش و در سطح ۸ dS/m افزایش نشان داد. کمترین درصد نشت لکترولیت در ٤dS/m مربوط به ژنوتیپ G8 به میزان ٤٦/۵۷ درصد و بیشترین خسارت به سلول مربوط به ژنوتیپ G9 (۸٦/۳۵ درصد) در سطح ۸ dS/m می‌باشد.

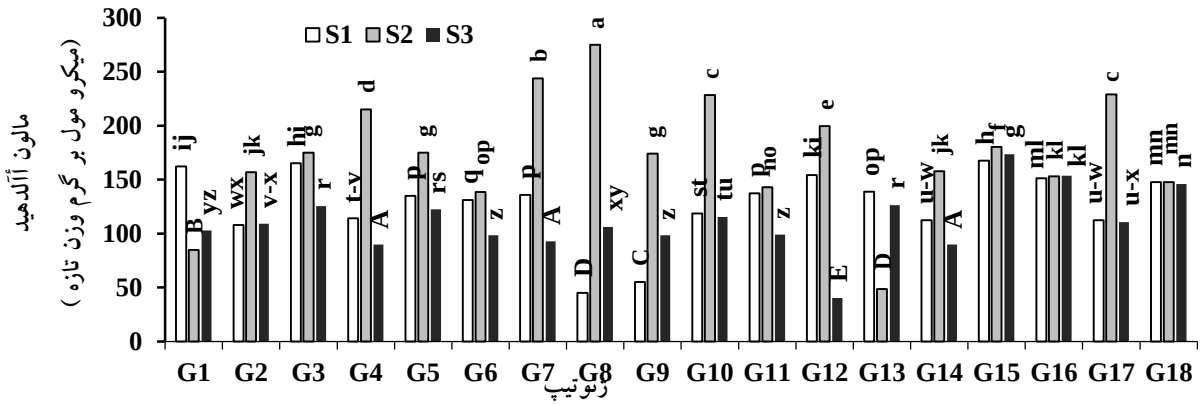
[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-20]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1400.10.42.26.8]

جدول ۳- تجزیه واریانس صفات بیوشیمیائی لاین‌های موتانت برنج و شاهدها تحت تنش شوری کلرید سدیم.

منابع تغییرات	درجه آزادی	پرولین	مالون‌دی‌آلدهید	درصد نشت الکترولیت
		میانگین مربعات (Mean Square)		
تکرار (R)	۲	۰/٦٥ **	٦٤/١٦ **	۷۰/۵۹ **
فاکتور A (زمان)	۲	۱/۰۳ **	۸۹۱۲۳/۲۳ **	٤٥٥/٤٨**
خطای آزمایشی (Ea)	٤	۰/۰۱	٤۲/۲۰	۰/۷۳
فاکتور B (شوری)	۲	۳۸/۷۳ **	۸۰۹٦۷/۸۸ **	۲۳۵۷/۸۵**
فاکتور C (ژنوتیپ)	۱۷	۲/۰۱ **	۵۲۹۷/۲٦**	١٦٨/٠٨**
زمان × شوری	٤	۰/٦٨ **	۳۳۰۰۱/۹۱ **	٤٧٥/٠٤ **
زمان × ژنوتیپ	۳٤	۰/٦۳ **	۳۵۳۸/٤۲ **	٦۳/۰۷**
شوری × ژنوتیپ	۳٤	۰/۵٦ **	۷۱۷۱/۷۱**	۱۷۰/۵۰**
زمان × شوری × ژنوتیپ	٦٨	۰/٤٦ **	٤۳٦۵/۷۹**	۷۸/٦۵**
خطای آزمایشی (Ebc)	۳۱۸	۰/۰۰۱	۱۰/۳۹	۰/۵۵
ضریب تغییرات (٪)		۳/۳۱	۲/۳۱	۰/٤٨

**** : معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد**

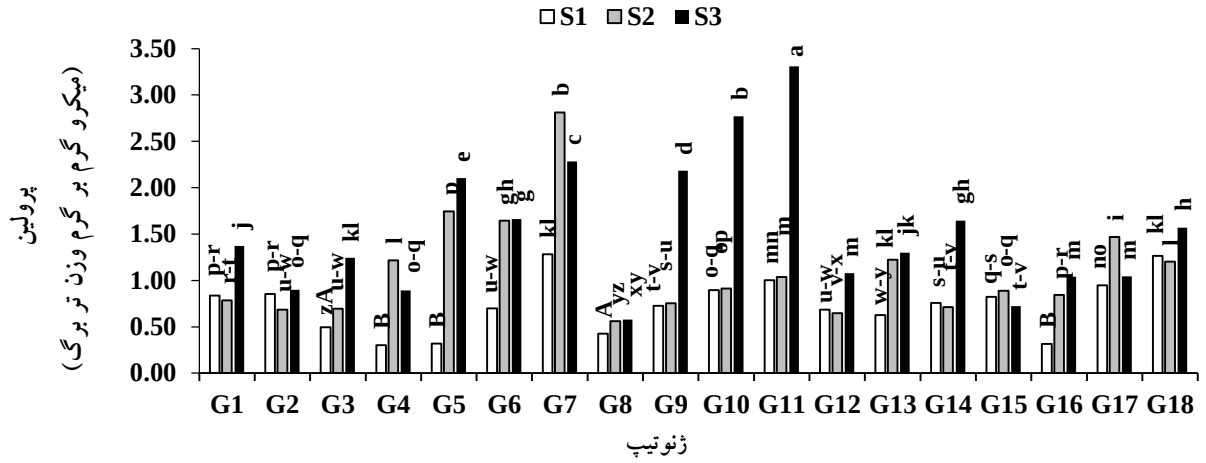


شکل ۱- برهمکنش ژنوتیپ در شوری برای غلظت مالون‌دی‌آلدهید (سه روز پس از تنش). S1: شرایط نرمال، S2: تنش شوری ٤dS/m، S3: تنش شوری ۸dS/m. میانگین‌هایی که دارای حداقل یک حرف مشترک هستند از نظر آزمون دانکن در سطح احتمال ۵٪ معنی‌دار نمی‌باشند.

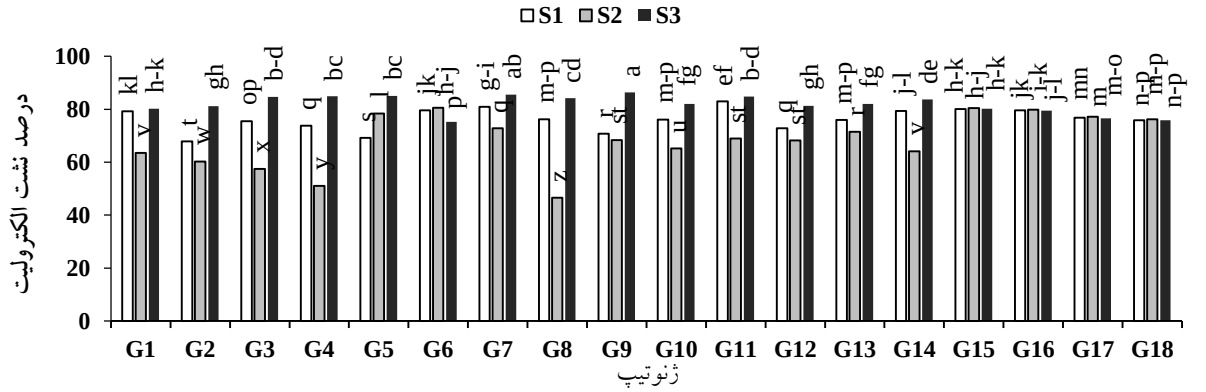
غلظت مالون‌دی‌آلدهید پس از شش روز اعمال تنش نشان می‌دهد که ژنوتیپ G13 دارای بیشترین میزان غلظت (۳٤۹/۵۵ میکرومول بر گرم) در سطح شوری ٤ dS/m بوده و ژنوتیپ G8 دارای کمترین میزان غلظت (۹۰/٦۲ میکرومول بر گرم) در شوری ۸ dS/m بوده است (شکل٤).

غلظت پرولین در شش روز پس از اعمال تنش شوری (شکل۵)، در سطح ۸dS/m در ژنوتیپ‌های G1، G5، G7، G8،G11، G12، G14 و همچنین شاهدهای متحمل G17 و G18 افزایش نشان دادند. بیشترین غلظت پرولین در این سطح مربوط به ژنوتیپ G12 با میزان ۲/٦٦ میکرومول بر گرم بوده است. در این تحقیق غلظت پرولین در ژنوتیپ G8 نسبت به زمان ۳ روز پس از اعمال تنش، افزایش معنی‌داری نشان داد. موسوی‌زاده و همکاران (۱۳۹۷) با ارزیابی میزان پرولین سه رقم برنج تحت تنش شوری ۱۲ dS/m گزارش نمودند، میزان پرولین در ژنوتیپ سنگ‌طارم (به عنوان یک ژنوتیپ متحمل به شوری) در تمامی زمان‌های نمونه‌گیری نسبت به IR29

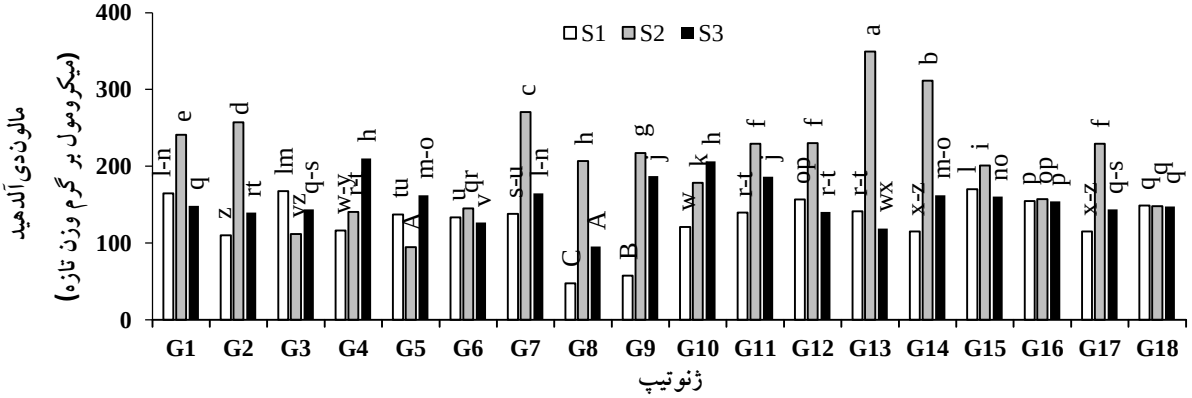
[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.23222727.1400.10.42.26.8]



شکل ۲- برهمکنش ژنوتیپ در شوری برای غلظت پرولین (سه روز پس از تنش) . S1: شرایط نرمال، S2: تنش شوری ٤dS/m، S3: تنش شوری ۸dS/m. *میانگین‌هایی که دارای حداقل یک حرف مشترک هستند از نظر آزمون دانکن در سطح احتمال ۵٪ معنی‌دار نمی‌باشند.



شکل ۳ - برهمکنش ژنوتیپ در شوری برای درصد نشت الکترولیت‌ها (سه روز پس از تنش). S1: شرایط نرمال S2: تنش شوری ٤dS/m S3: تنش شوری ۸dS/m. *میانگین‌هایی که دارای حداقل یک حرف مشترک هستند از نظر آزمون دانکن در سطح احتمال ۵٪ معنی‌دار نمی‌باشند.



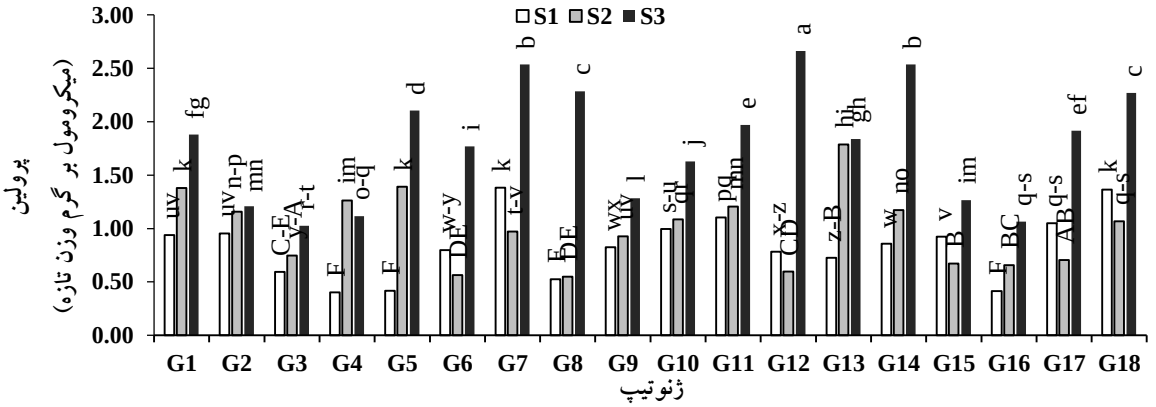
شکل ٤- برهمکنش ژنوتیپ در شوری برای غلظت مالوندی‌آلدهید (شش روز پس از تنش). S1: شرایط نرمال S2: تنش شوری ٤dS/m S3: تنش شوری ۸dS/m. *میانگین‌هایی که دارای حداقل یک حرف مشترک هستند از نظر آزمون دانکن در سطح احتمال ۵٪ معنی‌دار نمی‌باشند.

(ژنوتیپ حساس به شوری) افزایش معنی‌داری نشان داد.

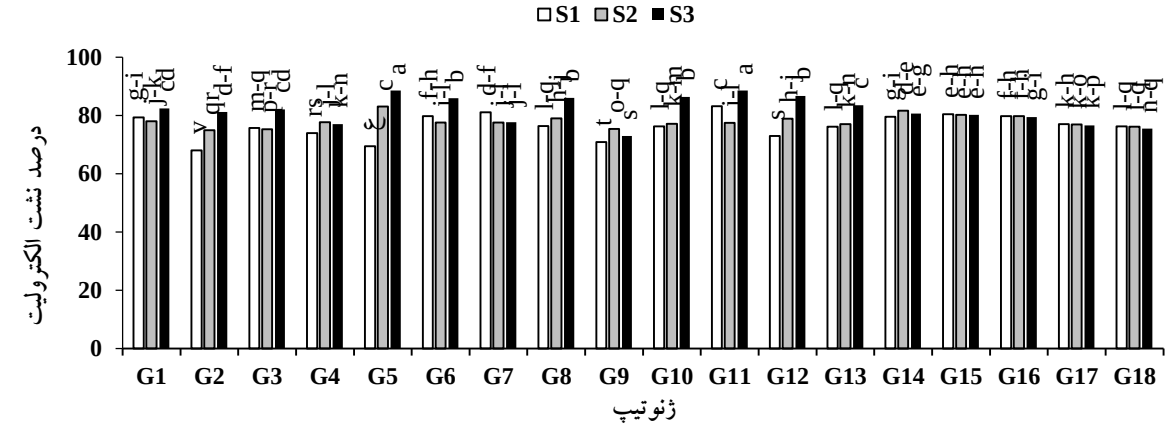
در زمان شش روز پس از تنش شوری برهمکنش ژنوتیپ در شوری برای درصد نشت الکترولیت‌ها، نشان می‌دهد که دو ژنوتیپ G5 و G10 به ترتیب به میزان ۸۸/۵٦ و ۸۸/٤۹ درصد

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-20]

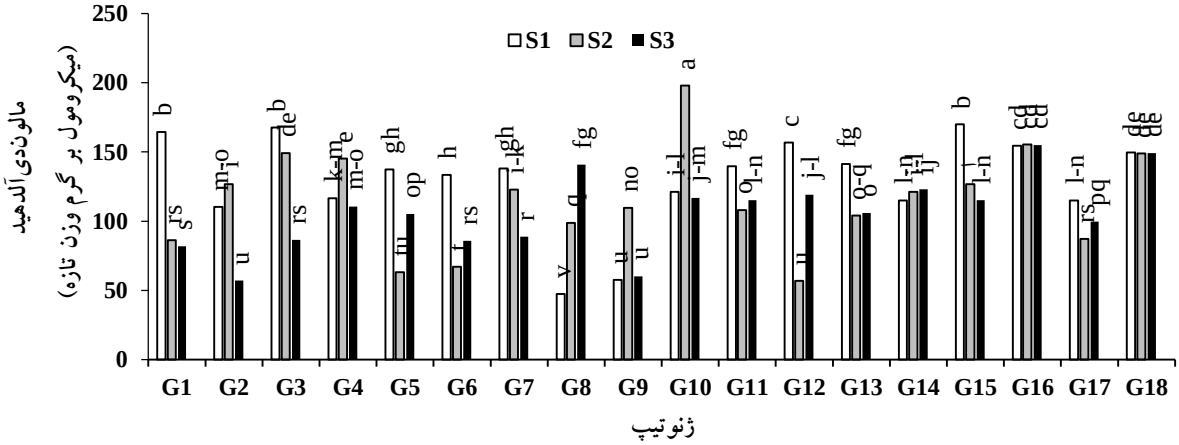
[DOR: 20.1001.1.23222727.1400.10.42.26.8]



شکل ۵- برهمکنش ژنوتیپ در شوری برای غلظت پرولین (شش روز پس از تنش). S1: شرایط نرمال S2: تنش شوری ٤dS/m S3: تنش شوری ۸dS/m. میانگین‌هایی که دارای حداقل یک حرف مشترک هستند از نظر آزمون دانکن در سطح احتمال ۵٪ معنی‌دار نمی‌باشند.



شکل ٦- برهمکنش ژنوتیپ در شوری برای درصد نشت الکترولیت‌ها (شش روز پس از تنش). S1: شرایط نرمال S2: تنش شوری ٤dS/m S3 تنش شوری ۸dS/m *میانگین‌هایی که دارای حداقل یک حرف مشترک هستند از نظر آزمون دانکن در سطح احتمال ۵٪ معنی‌دار نمی‌باشند.



شکل ۷- برهمکنش ژنوتیپ در شوری برای غلظت مالوندی‌آلدهید (نه روز پس از تنش). S1: شرایط نرمال S2: تنش شوری ٤dS/m S3: تنش شوری ۸dS/m. *میانگین‌هایی که دارای حداقل یک حرف مشترک هستند از نظر آزمون دانکن در سطح احتمال ۵٪ معنی‌دار نمی‌باشند.

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-20]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1400.10.42.26.8]

بیشترین خسارت به سلول را داشتند (شکل ٦).

با افزایش زمان نمونه‌برداری پس از نه روز اعمال تنش شوری، بیشترین میزان غلظت مالون‌دی‌آلدهید مربوط به ژنوتیپ G10 (۱۹۷/۹۳ میکرومول بر گرم) در سطح شوری ٤dS/m بوده و دو ژنوتیپ G2 و G9 دارای کمترین میزان غلظت به‌ترتیب با ۵۷/۱۳ و ٦۰/۲۳ میکرومول بر گرم در شوری ۸ dS/m بودند (شکل۷). در بین ارقام شاهد، با افزایش زمان نمونه‌برداری میزان غلظت MDA در ژنوتیپ متحمل G17 کمتر شده است. یافته‌های این پژوهش حاکی از آن است که غلظت MDA در تنش شوری ٤ dS/m در اکثر ژنوتیپ‌ها افزایش و با بالا رفتن سطح تنش در ۸ dS/m، کاهش می‌یابد. زمان نمونه‌برداری نه روز پس از اعمال تنش شوری، افزایش غلظت پرولین در ژنوتیپ‌ها را در سطح شوری ۸ dS/m نشان می‌دهد. در این سطح بیشترین غلظت پرولین مربوط به شاهد نونابوکرا با میزان ۳/۰۳ میکرومول بر گرم بوده است. همچنین ژنوتیپ‌های G6، G8، G11 و G14 بعد از شاهد مذکور دارای غلظت پرولین بالایی بودند (شکل ۸). یافته‌های این تحقیق حاکی از آن است که با افزایش زمان نمونه‌برداری تا نه روز پس از تنش شوری و همچنین افزایش سطح شوری تا ۸ dS/m میزان غلظت پرولین در ارقام متحمل افزایش نشان می‌دهد.

در زمان نه روز پس از تنش شوری، برهمکنش ژنوتیپ در شوری برای درصد نشت الکترولیت‌ها در شکل ۹ نشان می‌دهد که ژنوتیپ G14 کمترین میزان خسارت به سلول را به میزان ۳۷/٤۱ درصد در سطح **٤dS/m** داشت و بیشترین میزان خسارت به سلول مربوط به دو ژنوتیپ G10 و G13 بهترتیب به میزان ۸۸/۳۸ و ۸۷/۹۷ درصد بوده است. Bhattacharjee و Mukherje (2002) در تحقیقی اظهار نمودند میزان تخریب غشای سلولی و تولید مالون‌دی‌آلدهید در ارقام حساس برنج به شوری بسیار بیشتر از ارقام متحمل به شوری بود.

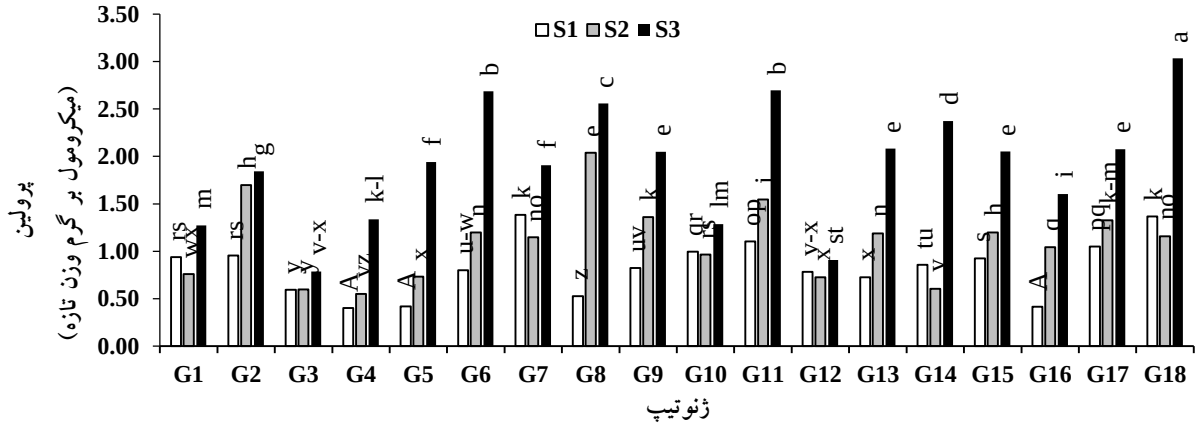
در بررسی که توسط Summart و همکاران (۲۰۱۰) بر میزان پرولین در گیاه برنج انجام شد اظهار نمودند که با توجه به تجمع بالای پرولین به نظر می‌رسد که این اسید آمینه نقش حیاتی در سلول‌های گیاهی در طول تنش شوری ایفا می‌کند. تأثیر تنش شوری روی پارامترهای فیزیولوژیکی در ۱۰٦ ژنوتیپ برنج نشان داد پرولین می‌تواند به‌عنوان یک شاخص مناسب جهت شناسایی ارقام حساس از متحمل به شوری به کار گرفته شود (Kanawapee *et al*., 2012). درصد نشت الکترولیت‌ها (تخریب غشاهای سلولی) با افزایش زمان نمونه‌برداری و بالا رفتن سطح شوری افزایش یافته که میزان خسارت در ژنوتیپ‌های متحمل کمتر می‌باشد. می‌توان بیان نمود افزایش نشت‌پذیری منجر به کاهش تورژسانس سلول‌ها، فرایندها، اختلال در فرایند آنزیم‌های دخیل در رشد گیاهچه شده که در نهایت منجر به کاهش رشد می‌گردد (Bandeoglu *et al*., 2004).

تجزیه کلاستر صفات بیوشیمیائی (شکل ۱۰) نشان می‌دهد که در زمان سه روز پس از تنش و شوری ۸dS/m (شکلc) ژنوتیپ‌ها به پنج گروه تقسیم شدند که دو شاهد حساس G15 و G16 در گروه چهارم و ژنوتیپ G6 به همراه دو شاهد متحمل G17 و G18 در گروه پنجم قرار گرفتند. در زمان شش روز پس از تنش و شوری ٤dS/m (شکلe) تجزیه کلاستر ژنوتیپ‌ها را به شش گروه تقسیم نمود که هفت ژنوتیپ (G1، G2، G4، G7، G9، G10 وG11) به همراه G17 و G18 در گروه چهارم قرار گرفتند. در همین زمان و شوری ۸dS/m (شکل f) ژنوتیپ‌ها به پنج گروه تقسیم شدند که دو ژنوتیپ G7 و G14 به همراه دو شاهد G17 و G18 در یک گروه قرار گرفتند. در زمان نه روز پس از تنش و شوری ۸dS/m ژنوتیپ‌ها به پنج گروه تقسیم و ژنوتیپ‌های G2، G6، G7 و G9 به همراه شاهد متحمل G17 در گروه پنجم قرار گرفتند.

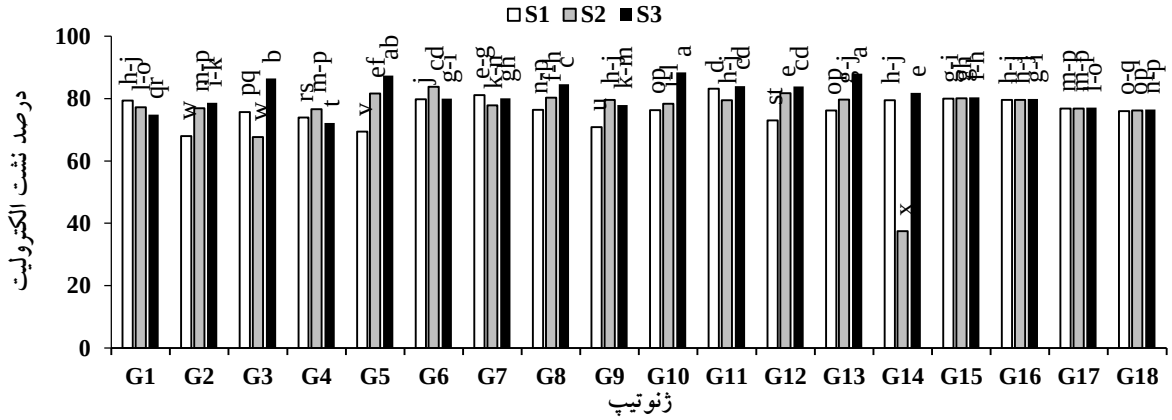
بررسی‌های مولکولی: بر اساس الگوی باندی سه آغازگر cgSSR مورد مطالعه در این تحقیق، شاهد حساس و متحمل انتخاب شدند. بر این اساس برای ژن *OsPEX11-1* دو شاهد نونابوکرا و سپیدرود، برای ژن *OsNac5* دو شاهد دیلمانی و سپیدرود و برای ژن *OsRacB(T)* دو شاهد نونابوکرا و IR29 انتخاب گردیدند. پروفایل ژل آگارز مربوط به آغازگرهای مرتبط به تنش شوری به همراه ارقام شاهد ارائه شده است (شکل ۱۱).

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-20]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1400.10.42.26.8]



شکل ۸- برهمکنش ژنوتیپ در شوری برای غلظت پرولین (نه روز پس از تنش). S1: شرایط نرمال S2: تنش شوری ٤dS/m S3: تنش شوری ۸dS/m. *میانگین‌هایی که دارای حداقل یک حرف مشترک هستند از نظر آزمون دانکن در سطح احتمال ۵٪ معنی‌دار نمی‌باشند.



شکل ۹- برهمکنش ژنوتیپ در شوری برای درصد نشت الکترولیت‌ها (نه روز پس از تنش). S1: شرایط نرمال S2: تنش شوری ٤dS/m S3: تنش شوری ۸dS/m. *میانگین‌هایی که دارای حداقل یک حرف مشترک هستند از نظر آزمون دانکن در سطح احتمال ۵٪ معنی‌دار نمی‌باشند.

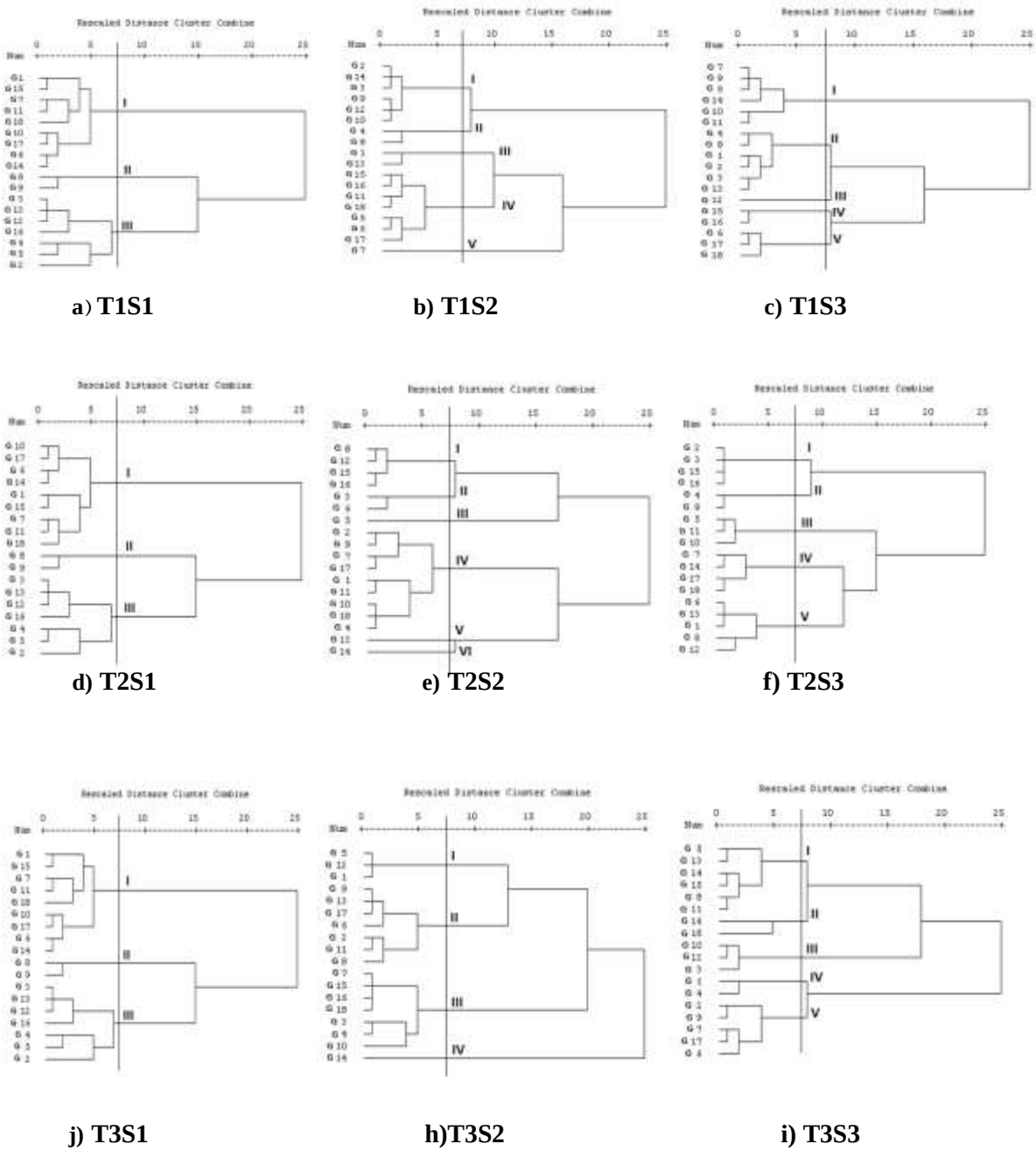
الگوی باندی ژن *OsPEX11-1* مربوط به ١٤ لاین موتانت نسل نهم به همراه دو شاهد نونابوکرا و سپیدرود (شکل١٢) شاهدهای متحمل و حساس را متمایز نموده بطوریکه شاهد نونابوکرا باند متحمل به وزن مولکولی 276bp را نشان می‌دهد. در این تحقیق زنوتیپ‌های G1، G2، G4، G8، G9 و G10 دارای باند متحمل و همردیف با شاهد متحمل نونابوکرا می‌باشد.

در شکل ١٣ الگوی باندی ژن *OsNac5* مربوط به ١٤ لاین مونانت نسل تهم به همراه دو شاهد دیلمانی و سپیدرود نشان می‌دهد این ژن توانسته شاهدهای متحمل و حساس را کاملاً متمایز نماید در این پروفایل ژنی باند متحمل مربوط به شاهد دیلمانی با وزن مولکولی 237bp می‌باشد. الگوی باندی این ژن تنها دو ژنوتیپ G4 و G10 را همردیف با شاهد دیلمانی نشان داد.

الگوی باندی ژن *OsRacB(T)* مربوط به ١٤ لاین مونانت نسل تهم به همراه دو شاهد نونابوکرا و IR29 در شکل ١٤حاکی است این ژن در محدوده 202bp دارای باند متحمل بوده و شاهد نونابوکرا در این محدوده دارای باند مذکور می‌باشد. در این تحقیق زنوتیپ‌های G1، G4، G8، G9، G10، G12 و G13 باندی مشابه و همردیف با شاهد نونابوکرا نشان دادند.

بررسی مولکولی ژن *OsPEX11-1* ، تعداد شش ژنوتیپ (G1، G2، G4، G8، G9 و G10) و ژن *OsRacB(T)*، تعداد هفت ژنوتیپ (G1، G4، G8، G9، G10، G12 و G13) را همردیف با شاهد متحمل نونابوکرا و همچنین بررسی مولکولی

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.23222727.1400.10.42.26.8]



a) T1S1 **b) T1S2** **c) T1S3**

d) T2S1 **e) T2S2** **f) T2S3**

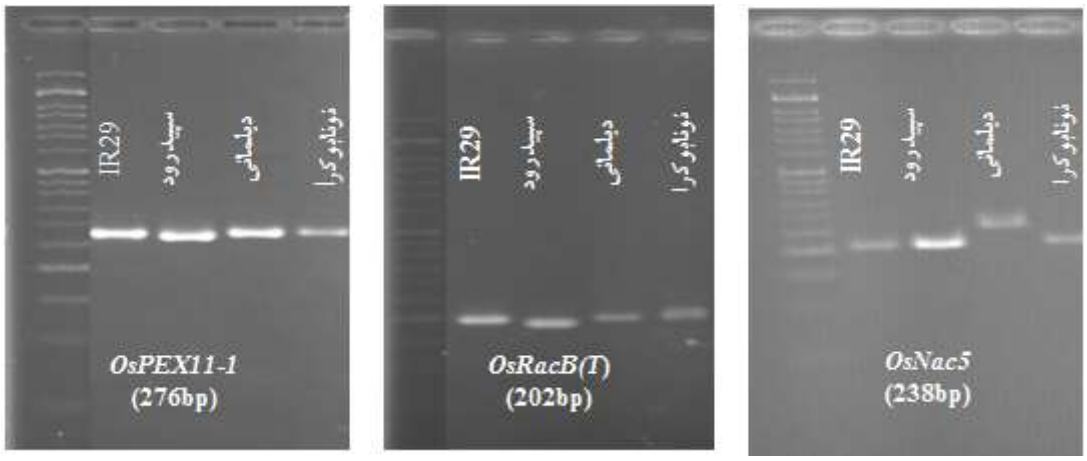
j) T3S1 **h)T3S2** **i) T3S3**

شکل۱۰ – دندروگرام مربوط به صفات بیوشیمیائی مورد مطالعه در این تحقیق به روش وارد (Ward). S1، S2 و S3 به ترتیب شرایط بدون تنش، تنش ٤dS/m و ٨dS/m و T1، T2 و T3 زمان سه روز، شش روز و نه روز پس از تنش شوری می‌باشد. a) زمان سه روز پس از تنش و شرایط بدون تنش b) زمان سه روز پس از تنش و شوری ٤dS/m c) زمان سه روز پس از تنش و شوری ٨dS/m d) زمان شش روز پس از تنش و شرایط بدون تنش e) زمان شش روز پس از تنش و شوری ٤dS/m f) زمان شش روز پس از تنش و شوری ٨dS/m j) زمان نه روز پس از تنش و شرایط بدون تنش h) زمان نه روز پس از تنش و شوری ٤dS/m i) زمان نه روز پس از تنش و شوری ٨dS/m .

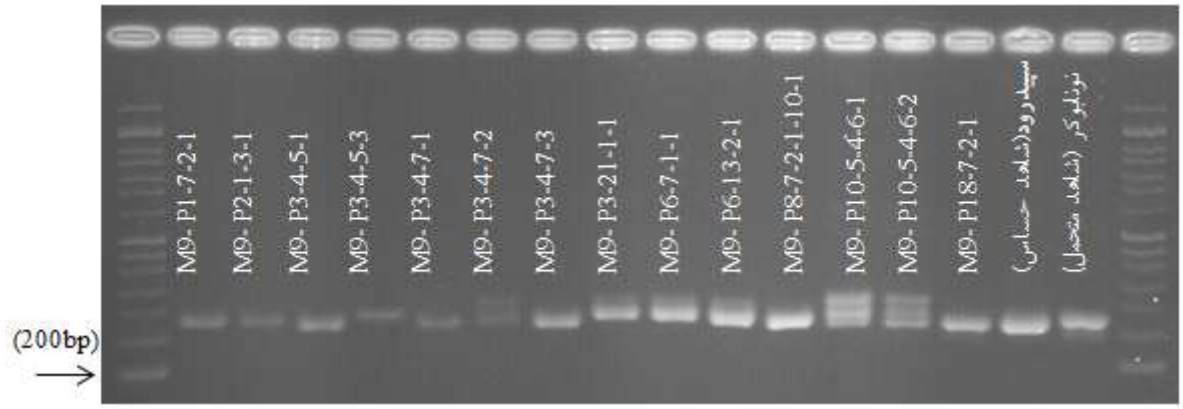
ژن *OsNac5*، تنها دو ژنوتیپ G4 و G10 را همردیف با شاهد متحمل دیلمانی نشان دادند. با توجه به نتایج بیوشیمیائی و مولکولی به نظر می‌رسد یکی از ژن‌های دخیل در کاهش سطح پراکسیداسیون چربی (میزان MDA) و تجمع پرولین در

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-20]

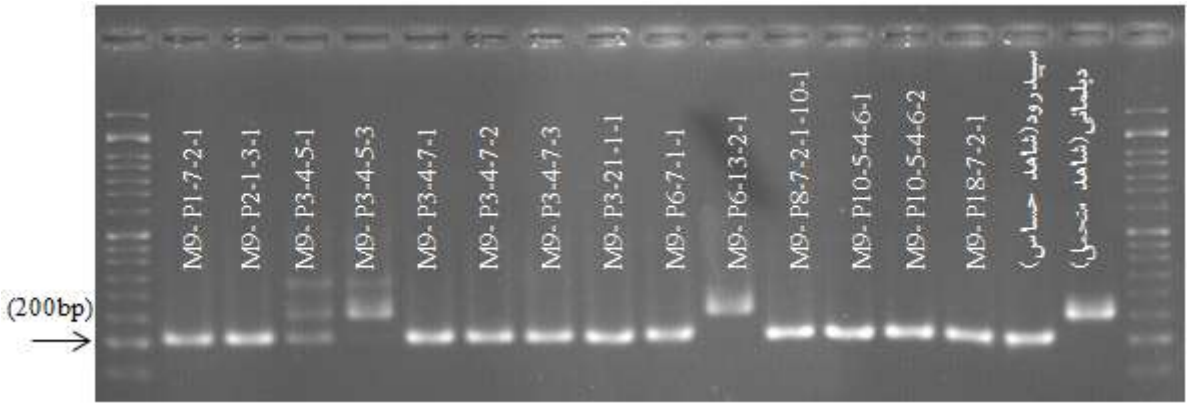
[DOR: 20.1001.1.23222727.1400.10.42.26.8]



شکل۱۱- الگوی باندی ژن‌های *OsPEX11-1*، *OsRacB(T)* و *OsNac5* مربوط به ارقام شاهد



شکل۱۲- الگوی باندی ژن (276bp) *OsPEX11-1* مربوط به ۱۴ لاین موتانت به همراه ارقام شاهد



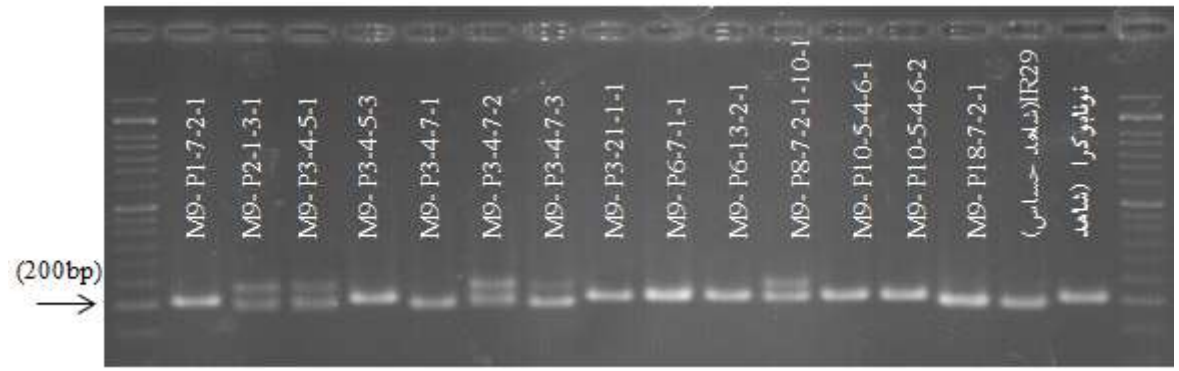
شکل۱۳- الگوی باندی ژن (237bp) *OsNac5* مربوط به ۱۴ لاین موتانت به همراه ارقام شاهد

سلول در ژنوتیپ‌های موتانت مورد مطالعه، ژن *OsPEX11* باشد که می‌تواند در شناسایی ارقام برای بهبود تحمل به تنش شوری در گیاه برنج موثر باشد. همچنین ژن *OsRacB* که ابتدا در قسمت ریشه و سپس بلافاصله در قسمت ساقه و برگ افزایش بیان نشان میدهد و باعث تحمل گیاه به شوری می‌شود را می‌توان به عنوان یکی از ژن‌های موثر در تحمل به تنش شوری در نظر گرفت.

بررسی‌های عملکردی: نتایج تجزیه واریانس صفت وزن

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-20]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1400.10.42.26.8]



شکل۱۴- الگوی باندی ژن *OsRacB*(T) (202bp) مربوط به ۱۴ لاین موتانت به همراه ارقام شاهد

جدول ٤- مقایسه افت عملکرد ناشی از تنش و شاخص تحمل به تنش در ژنوتیپ‌ها

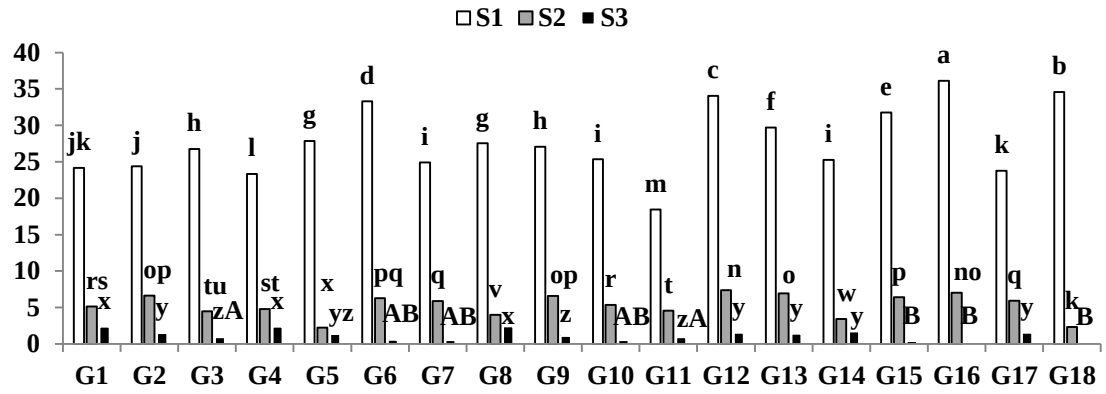
	ژنوتیپ / شاخص شوری	G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8	G9
٤ dS/m	افت عملکرد(g)	۱۹/۰۲	۱۷/۷٦	۲۲/۲٤	۱۸/۵۱	۲٤/۵۸	۲۷/۰۲	۱۹/۰۲	۲۲/۵٤	۲۰/٤۷
	افت عملکرد(درصد)	۷۸/٦۹	۷۲/۸۲	۸۳/۱۷	۷۹/٤۱	۸۸/۲۹	۸۱/۱۷	۷٦/۳۲	۸۱/۸۷	۷۵/٦۵
	شاخص سطح تحمل	۰/۲۱	۰/۲۷	۰/۱۷	۰/۲۱	۰/۱۲	۰/۱۹	۰/۲٤	۰/۱۸	۰/۲٤
۸ dS/m	افت عملکرد(g)	۲۱/۸۱	۲۲/۹۰	۲۵/۸۰	۲۰/۹۵	۲٦/٤۷	۳۲/۷۳	۲٤/۳۸	۲۵/۱۲	۲۵/۹٤
	افت عملکرد(درصد)	۹۰/۲٤	۹۳/۸۹	۹٦/٤۸	۸۹/۸۸	۹۵/۰۸	۹۸/۳۲	۹۷/۸۳	۹۱/۲۵	۹۵/۸٦
	شاخص سطح تحمل	۰/۱	۰/۰٦	۰/۰٤	۰/۱	۰/۰۵	۰/۰۲	۰/۰۲	۰/۰۹	۰/۰٤

ادامه جدول ٤- مقایسه افت عملکرد ناشی از تنش و شاخص تحمل به تنش (STI) در ژنوتیپ‌ها

	ژنوتیپ / شاخص شوری	G10	G11	G12	G13	G14	G15	G16	G17	G18
٤ dS/m	افت عملکرد(g)	۱۹/۹۸	۱۳/۸٦	۲٦/٦۸	۲۲/۷۹	۲۱/۸٤	۱۲/۳۵	۲۵/۵۱	۱۹/۹۱	۱۵/٤۷
	افت عملکرد(%)	۷۸/۸۵	۷۵/۱٦	۷۸/۳٦	۷٦/٦۸	۸٦/٤٦	٦۵/۸۰	۷۸/٤۰	۷٦/۹۹	۷۹/۰۱
	شاخص سطح تحمل	۰/۲۱	۰/۲۵	۰/۲۲	۰/۲۳	۰/۱٤	۰/۳٤	۰/۲۲	۰/۲۳	۰/۲۱
۸ dS/m	افت عملکرد(g)	۲٤/۸۰	۱۷/۵۰	۳۲/۵۱	۲۸/۳۱	۲۳/۵۵	۱۸/۳۹	۳۲/۲٦	۲٤/۳۲	۱۸/۸۳
	افت عملکرد(%)	۹۷/۸۷	۹٤/۹۰	۹۵/٤۸	۹۵/۲٦	۹۳/۲۳	۹۷/۹۸	۹۹/۱٤	۹٤/۰٤	۹٦/۱۷
	شاخص سطح تحمل	۰/۰۲	۰/۰۵	۰/۰۵	۰/۰۵	۰/۰۷	۰/۰۲	۰/۰۱	۰/۰٦	۰/۰٤

کل دانه در هر بوته نشان داد، برهمکنش ژنوتیپ در شوری در سطح یک درصد معنی‌دار بوده است (نتایج نشان داده نشد). نتایج برهمکنش ژنوتیپ در شوری برای وزن کل دانه در هر بوته (گرم) (شکل ۱۵) حاکیست در شرایط بدون تنش بین ارقام شاهد، G16 (سپیدرود) دارای وزن دانه در هر بوته بالاتری بوده اما با افزایش سطح شوری تا **۸dS/m** حساسیت بالایی نشان داده و وزن دانه در هر بوته معادل ۰/۲۸گرم داشت، در این سطح شوری G17 (شاهد دیلمانی) تحمل

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.23222727.1400.10.42.26.8]



شکل ۱۵- برهمکنش ژنوتیپ در شوری برای وزن کل دانه در هر بوته (گرم)S1 .: شرایط نرمال S2: تنش شوری ٤dS/m S3: تنش شوری ۸dS/m. *میانگین‌هایی که دارای حداقل یک حرف مشترک هستند از نظر آزمون دانکن در سطح احتمال ۵٪ معنی‌دار نمی‌باشند.

خوبی نشان داده و دارای وزن دانه در هر بوته ۱/٥٤ گرم بود. بیشترین وزن دانه در هر بوته در این سطح شوری مربوط به ژنوتیپ G8 (۲/٤۱ گرم) بوده است. به لحاظ وزن دانه در هر بوته ژنوتیپ‌های G1، G4 و G8 در یک سطح و ژنوتیپ‌های G2، G12، G13 و G14 به همراه G17 (شاهد متحمل دیلمانی) در سطح دوم قرار گرفتند. نتایج جدول ٤ حاکیست در سطح شوری **۸dS/m**، ارقام شاهد متحمل نسبت به ارقام شاهد حساس شاخص تحمل بیشتری نشان دادند. بیشترین شاخص تحمل مربوط به دو ژنوتیپ G1 و G4 با شاخص تحمل ۰/۱ می‌باشد. در این بررسی ژنوتیپ‌های G1، G4، G8 و G14 شاخص تحمل بیشتری نسبت به شاهد متحمل دیلمانی G17 (معادل ۰/۰٦) نشان دادند. از نظر میزان افت عملکرد نیز در سطح **۸dS/m**، ژنوتیپ‌های G1 (۹۰/۲٤ درصد)، G4 (۸۹/۹ درصد) و G8 (۹۱/۲٥ درصد) نسبت به شاهد متحمل دیلمانی با ۹٤ درصد، افت کمتری نشان دادند.

برنج گیاهی نیمه حساس به شوری است. آستانه تحمل برنج نسبت به تنش شوری3 ds/m می‌باشد و به ازای افزایش یک واحد EC از آستانه تحمل، عملکرد به میزان ۱۲ درصد کاهش می‌یابد (سلحشور و همکاران، ۱۳۹۲). به نظر می‌رسد در ژنوتیپ‌های مذکور، افزایش غلظت پرولین و کاهش MDA در زمان‌های بالاتر، باعث زنده‌مانی و در نهایت افزایش وزن دانه در هر بوته می‌گردد.

نتیجه‌گیری کلی

در مجموع با شناخت برخی سازوکارهای بیوشیمائی مؤثر در تنش شوری در سری زمانی متفاوت در این تحقیق (پرولین، مالون‌دی‌آلدهید و درصد نشت الکترولیت‌ها) و تجزیه کلاستر و با تاکید بر ارزیابی مولکولی برخی ژن‌های موثر و وزن دانه در هر بوته (گرم)، شاخص تحمل به تنش (STI) و میزان افت عملکرد در سطوح مختلف شوری می‌توان پیش‌بینی نمود که ژنوتیپ‌های G1 از موتانت سنگ‌طارم، G2 از موتانت رشتی، G4 از موتانت هاشمی و G9 از موتانت چالوسی در اولویت اول و ژنوتیپ‌های G8 از موتانت هاشمی، G12 و G13 از موتانت نعمت در اولویت دوم به عنوان لاین‌های امیدبخش موتانت متحمل به تنش شوری بوده و پیشنهاد می‌شود از آنها در جهت افزایش بهره‌وری و بالابردن عملکرد در مزارعی که با شوری آب و خاک مواجه هستند استفاده نمود. نتایج حاکی از آن است که بیشتر ارقام بومی بخاطر ماهیت هتروژن بودن آنها نسبت به تنش شوری تحمل بیشتری نشان دادند همچنین به نظر می‌رسد با پرتودهی اشعه گاما و ایجاد تنوع در ارقام بومی و اصلاح شده می‌توان به منابع جدید شوری دست یافت.

قدردانی

از پژوهشکده ژنتیک و زیست فناوری کشاورزی طبرستان، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری به خاطر تامین

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-20]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1400.10.42.26.8]

مالی، همچنین از کارشناسان بخش فنی- تحقیقاتی برنج پژوهشکده تشکر می‌شود.

منابع

احمدی‌خواه، ا.، شجاعیان، ه.، پهلوانی، م. ه. و نیری‌پسند، ل. (۱۳۹۳) شناسایی لاینهای موتانت متحمل به شوری در برنج و انگشت نگاری آنها با نشانگر ISSR. ژنتیک نوین۹: ۳۱۲ – ۲۹۹.

اولادی، م.، نعمت‌زاده، ق.، رحیمی، م.، افخمی قادی، ع.، قلی‌زاده، ع.، مظفری، ک. و ضیایی. ا. (۱۳۹٤) بررسی تأثیر پرتودهی اشعه گاما در ایجاد تنوع در برخی ارقام محلی و اصلاح شده برنج. مجله علوم و فنون هسته‌ای: ۸۷-۸۰.

حق جو، م.، روستایی، م. ج.، بامداد، ز. و جهانگیری، ب. (۱۳۸٦) اثر تنش خشکی روی ۹ ژنوتیپ گندم در مرحله جوانه زنی در استان فارس. اولین کنفرانس تکنولوژی و علوم بذر. ایران. گرگان.

رنجبر، غ.، و بناکار، م. ح. (۱۳۸٦) تاثیر تاریخ کاشت و تنش شوری بر عملکرد دانه و عقیمی سنبله گندم، رقم بم. تنشهای محیطی در علوم زراعی.

سلحشور دلیوند، ف.، صدرالدینی، ع. ا.، ناظمی، ا. ح.، دواتگر، ن. و نیشابوری، م .ر. (۱۳۹۲) شبیه‌سازی اثر هم‌زمان تنش‌های شوری و خشکی بر عملکرد دانه برنج رقم هاشمی. علوم زراعی ایران ۱۵: ۳۲۰-۳۳٦.

شکرپور، م.، و اسفندیاری، ع. ا . (۱۳۹۳) گروه بندی ارقام مختلف گندم از نظر تحمل شوری بر اساس برخی شاخص های بیوشیمایی و فیزیولوژیک. اصلاح گیاهان زراعی ٦: ٥٤ – ٦٦.

صادقی آهنگری، م.، باقری، ن. و بابائیان جلودار، ن. (۱۳۹۷) ارزیابی واکنش لاین‌های موتانت برنج طارم محلی (M6) به تنش شوری در مرحله جوانه‌زنی. پژوهشنامه اصلاح گیاهان زراعی ۱۰: ٦-۱.

صبوری، ح.،ع، رضایی. و ع، مومنی. (۱۳۸۷) ارزیابی تحمل به شوری در ارقام بومی و اصلاح شده برنج ایرانی. علوم آب و خاک (علوم و فنون کشاورزی و منابع طبیعی ۱۲: ٦۳- ٤۷.

قدیرنژاد شیاده، ر.، اسماعیلی، م. ع.، پیردشتی، ه. ا. و نعمت زاده، ق. (۱۳۹۹) ارزیابی فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی نسل ششم لاینهای موتانت برنج (*Oryza sativa L*) تحت تنش شوری. مجله فرایند و کارکرد گیاهی ۹: ۷۲-۵۷.

موسوی‌زاده، ز. س.، نجفی زرینی، ح.، هاشمی پطرودی، س. ح. ر.، و کاظمی تبار، س. ک. (۱۳۹۷) ارزیابی میزان پرولین، کلروفیل و مالون‌آلدئید در ارقام حساس و متحمل برنج تحت تنش کلریدسدیم. پژوهشنامه اصلاح گیاهان زراعی ۲۵: ۳۵-۲۸.

میردارمنصوری، ش.، ن، بابائیان جلودار. و ن، باقری. (۱۳۹۱) تأثیر تنش NaCl بر رشد زایشی برنج ایرانی بر اساس شاخصهای تحمل و انتخاب به کمک روش بای پلات. مجله پژوهشهای تولید گیاهی ۱۹: ۸٤-٦۷.

نورالهی، ج. (۱۳۹۷) غربالگری لاین‌های موتانت M7 برنج با غلظت‌های مختلف شوری با استفاده از نشانگرهای مورفولوژیک و مولکولی (SSR) و مقایسه عملکرد لاینهای برتر. پایان نامه کارشناسی ارشد. دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری.

Ashraf, M. (2009) Biotechnological approach of improving plant salt tolerance using antioxidants as markers. Biotechnology Advances, 27: 84-93

Bandeoglu, E. Eyidogan, F. Yücel, M. and Oktem, H. A. (2004) Antioxidant responses of shoots and roots of lentil to NaCl-salinity stress. Plant Growth Regulation 42: 69-77.

Bates, L. S. Waldren, R. P. and Teare, I. D. (1973) Rapid determination of Free Proline for water- Stress studies. Plant and Soil 39: 205-207.

Bhattacharjee, S. and Mukherjee, A. K. (2002) Salt stress induced cytosolute accumulation, antioxidant response and membrane deterioration in three rice cultivars during early germination. Seed Science and Technology 30: 279-287.

Cui P, Liu H, Islam F, Li L, Farooq MA, Ruan S and Zhou W (2016) *OsPEX11*, a Peroxisomal Biogenesis Factor 11, Contributes to Salt Stress Tolerance in *Oryza sativa*. Frontiers in Plant Science 7:1357

Doyle J, (1987) A rapid procedure for DNA purification from small quantities of fresh leaf tissue. Phytochem Bull 19:11–15.

Farooq, Sh. and Farooqe, A. (2006) The use of cell membrane stability (CMS) technique to screen for salt tolerant wheat varieties. J. Plant Physiol 163: 629-637.

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-20]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1400.10.42.26.8]

Fernandez GCJ. (1992) Effective selection criteria for assessing stress tolerance. In: Proceedings of the International Symposium on Adaptation of Vegetables and Other Food Crops in Temperature and Water Stress (ed. Kuo G.),Tainan, Taiwan.

Heath, R. L., & Packer, L. (1968) Photoperoxidation in isolated chloroplasts: I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. Archives of Biochemistry and Biophysics 125: 189-198.

Kanawapee, N. Sanitchon, J. Lontom, W. and Threerakulpisut, P. (2012) Evaluation of salt tolerance at the seedling stage in rice genotypes by growth performance, ion accumulation, proline and chlorophyll content. Plant and Soil 358: 235-249.

Kawaura K, Mochida K, Ogihara Y (2008) Genome-wide analysis for identification of salt-responsive genes in common wheat. Functional & Integrative Genomics 8: 277–86

Kazemi Sh, eshghizade H R and Zahedi M (2016) Agromorphological response of local and modified Iranian rice genotypes to salinity of nutrient solution. Journal of Science and Technology of Greenhouse Culture 7: 163-153.

KhoshKholghSima, N.A., Askari, H., Hadavand, H., Mirzaei, H., Pessarakli, M., (2009) Genotype-dependent differential responses of three forage species to Ca supplement in saline conditions. Journal Plant Nutrition 32:, 579-597.

Kumae, S.G., Reddy, A.M., and Sudhakar, C. (2003) NaCl effects on proline metabolism in two high yielding genotypes of mulberry (*Morus Alba L.)* white contrasting salt tolerance. Plant Science 165: 1245-1251.

Kutubuddin AM, Ananda BD, Showkat AG Tapan Kumar M (2015) Identification and analysis of novel salt responsive candidate gene based SSRs (cgSSRs) from rice (*Oryza sativa* L.). BMC Plant Biology. DOI 10.1186/s12870-015-0498-1

Luo M., Su-Hai, G.U., Shu-Hui, Z., Fang, Z. and Nai-Hu, W.U. (2006) Rice GTPase OsRacB: Potential Accessory Factor in Plant Salt-stress Signaling. Acta Biochimica Et Biophysica Sinica 38: 393–402.

Mekawy A. M. M., Assaha D.V.M., Yahagi, H., Tada, Y., Ueda, A. and Saneoka, H. (2015) Growth, physiological adaptation, and gene expression analysis of two Egyptian rice cultivars under salt stress. Plant Physiology and Biochemistry 87. 17-25.

Moradi, F. 2002. Physiological characterization of rice cultivars for salinity tolerance during vegetative and reproductive stages. Los Baños, Laguna, Philippines, 190.

Munns, R., James, R. A. and Läuchli, A. (2006) Approaches to increasing the salt tolerance of wheat and other cereals. Journal of Experimental Botany 57: 1025-1043.

Nabiollahi, K., Taghizadeh-Mehrjardi, R., Kerry, R. and Moradian, S (2017) Assessment of soil quality indices for salt-affected agricultural land in Kurdistan Province, Iran. Ecological Indicators 83: 482-494.

Okamura, M., Umemoto, N. and Onishi, N. (2012) Breeding glittering carnations by an efficient mutagenesis system. Plant Biotechnology 29: 209-214.

Pardo, J. M. (2010) Biotechnology of water and salinity stress tolerance. Current Opinion Biotechnology 21: 185-196.

Parida, A.K. and Das, A.B. (2004) Salt tolerance and salinity effects on plants: a Review. Ecotoxicology and Environmental Safety 60: 324-349

Pessarakli, M., and PolShekanePahlavan-Rad, M. R. (2009) Response of wheat plants to zinc, iron, and manganese applications, and uptake and concentration of Zn, Fe, and Mn in wheat grains. Commun. Soil Science Plant 7-8: 1322-1332.

Pirasteh-Anosheh, H., Emam, Y and Sepaskhah, A. R. 2015. Improving barley performance by proper foliar applied salicylic-acid under saline conditions. International Journal of Plant Production 9: 467-486

Summart, J., Thanonkeo, P., Panichajakul, S., Prathepha, P., & McManus, M. T. (2010) Effect of salt stress on growth, inorganic ion and proline accumulation in Thai aromatic rice, Khao Dawk Mali 105, callus culture. African Journal of Biotechnology 9: 22-34

Surekha Rao, P. Mishra B., Gupta S. R. and Rathore A. (2008) Reproductive stage tolerance to salinity and alkality stresses in rice genotypes. Plant Breeding 127: 256-261.

Takasaki H, Maruyama K, Kidokoro S (2010) The abiotic stress-responsive NAC-type transcription factor OsNAC5 regulates stress-inducible genes and stress tolerance in rice. Molecular Genetics and Genomics 284: 173–183.

Wu, T. L, W. Kao, C. H. Hong, C. (2015) Gene knockout of *Glutathione reductase 3* results in increased sensitivity to salt stress in rice. Plant Molecular Biology 87: 555-564.

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-20]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1400.10.42.26.8]

Identification of rice mutants tolerant to salt stress via biochemical, quantitative and molecular evaluation

Morteza Oladi Ghadikolaei[1], Ghorban Ali Nematzadeh Ghara[1*], Gholam Ali Ranjbar[2], Seyyed Hamidreza Hashemi-petroudi[3]

[1]Department of Plant Breeding, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Genetic and Agricultural Biotechnology Institute of Tabarestan ,Iran.
[2] Department of Plant Breeding, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Iran.
[3] Department of Genetic Engineering and Biology, Genetic and Agricultural Biotechnology Institute of Tabarestan , Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Iran.
(Received: 27/10/2020, Accepted: 23/02/2021)

Abstract

To identify mutant lines (M9) rice of saline tolerant, and evaluation of some effective biochemical traits (seedling phase) an experiment as a split factorial based on a randomized complete block design with three replications in the greenhouse of Genetics and Agricultural Biotechnology Institute of Tabarestan (GABIT), was done in 2019. The main factor included sampling time (3, 6 and 9 days after stress) and sub-factors included salinity stress in three levels of NaCl (0, 4 dS/m and 8 dS/m (Adding salt to the water and paddy soil and then saturated salt extraction)) and genotypes (14 mutants (M9), 2 susceptible controls of Sepidrood, IR29 and 2 controls tolerant of Dailamani, Nonabokra). Also, identification of some genes effective in salinity stress was performed using three cgSSR microsatellite primers and then, the total grain weight per plant and STI index were evaluated as factorial. Analysis of variance showed that the main and the interaction effects were significant for all traits at 1% probability level. At the time of sampling (9 days after stress) and salinity of 8dS/m, proline concentration in tolerant genotypes increased whereas malondialdehyde content decreased. In nine days after stress and salinity 8 dS/m, cluster analysis divided the genotypes into five groups and four genotypes along with the tolerant G17 were in the fifth group. Molecular analysis of the band pattern of *OsPEX11-1*, *OsNac5* and *OsRacB (T)* primers showed 6, 2 and 7 genotypes, respectively, in the same order as the tolerant genotypes. Four genotypes at salinity 8dS/m had higher total grain weight per plant than Dailamani. Finally, considering the effective biochemical properties and cluster analysis results, and with emphasis on molecular and quantitative evaluation it can be suggested that G1 genotypes from Sang-Tarom mutant, G2 from Rashti mutant, G4 from Hashemi mutant and G9 from Chalousi mutant in the first priority and G8 genotypes from Hashemi mutant, G12 and G13 from mutant Nemat in the second priority can be used as promising saline-tolerant lines in farms facing salinity stress (soil and water).

***Keywords*:** Biochemical, Salinity stress, Cluster analysis, Mutant and Molecular.

Corresponding author, Email: gh.nematzadeh@sanru.ac.ir

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-20]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1400.10.42.26.8]