بررسی تغییرات ناشی از جهش با اتیل‌متان‌سولفونات (EMS) در لاین‌های موتانت برنج با نشانگر ISSR

Assessment of EMS-induced Variations In rice Mutant Lines Using ISSR Marker

اسدالله احمدی‌خواه[۱*]، هدا شجاعیان[۲]، محمدهادی پهلوانی[۳] و لیلا نیری‌پسند[۴]

تاریخ دریافت: ۹۲/۰۷/۰۱ تاریخ پذیرش: ۹۳/۱۲/۱۹

چکیده

استفاده از جهش جهت ایجاد تنوع ژنتیکی و مواد ژنتیکی جدید از دیرباز متداول بوده و از آن برای بهبود خواص کمّی و کیفی مختلف در گیاهان سود جسته‌اند. در این تحقیق، هجده لاین موتانت برنج که برای پاکوتاهی، تعداد پنجه زیاد، زودرسی و عملکرد بالا از بین یک جمعیت موتانت حاصل از جهش‌زایی رقم الیت ندا با اتیل‌متان‌سولفونات (EMS) انتخاب شده بودند، مورد ارزیابی مولکولی با آغازگرهای ISSR قرار گرفتند. از ۱۰ آغازگر مورد استفاده، ۸ آغازگر DNA ژنوتیپ‌های مختلف را تکثیر کردند. تعداد کل نوارهای تولید شده ۶۷ نوار (به ازای هر آغازگر به‌طور متوسط ۸/۴ نوار) بود که ۵۳/۷ درصد آن‌ها چندشکلی بین ژنوتیپ‌ها را نشان دادند. متوسط ضریب تنوع ژنی نئی در جمعیت مورد مطالعه، ۱۴/۱ درصد به‌دست آمد. بیشترین شباهت به رقم مادری (۸۶/۸ درصد) مربوط به گروه موتانت‌های پرعملکرد و کمترین شباهت (۷۶/۷ درصد) مربوط به گروه موتانت‌های پرپنجه بود. تجزیه خوشه‌ای با روش UPGMA، رقم مادری را در یک گروه و ۴ دسته لاین‌های موتانت را در گروه جداگانه‌ای قرار داد. تجزیه خوشه‌ای در هر گروه از لاین‌های موتانت نیز به‌طور جداگانه انجام شد که به استثنای دسته موتانت‌های انتخابی برای تعداد پنجه زیاد، در هر سه دسته دیگر رقم مادری به‌تنهایی در یک گروه و همه موتانت‌های انتخابی در گروه جداگانه‌ای قرار گرفتند. براساس نتایج این تحقیق، می‌توان نتیجه‌گیری کرد که تکنیک جهش برای ایجاد تنوع ژنتیکی در برنج مطلوب بوده و از نشانگرهای ISSR می‌توان برای شناسایی لاین‌های موتانت در جمعیت‌های حاصل از جهش‌زایی با EMS استفاده کرد.

واژه‌های کلیدی: اتیل‌متان‌سولفونات، برنج، موتانت، نشانگر مولکولی

۱. استادیار گروه بیوتکنولوژی، دانشکده مهندسی انرژی و فناوری‌های نوین، دانشگاه شهید بهشتی تهران
۲. دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده تولید گیاهی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان
۳. دانشیار گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده تولید گیاهی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان
۴. دانش‌آموخته کارشناسی‌ارشد، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده علوم زراعی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری
*: نویسنده مسوول Email: a_ahmadikhah@sbu.ac.ir

مقدمه

تکنیک جهش برای بهبود تقریباً تمام صفات مهم زراعی، از تحمل به تنش‌های زنده (مانند شوری، سرما، اسیدیته و ...) تا مقاومت به بیماری، از کیفیت غذایی تا بازارپسندی و از ساختمان گیاه تا پتانسیل محصول به کار گرفته شده است *شو و لاگودا* (Shu and Lagoda, 2007). این تکنیک مقرون به صرفه بوده و زمان اصلاح یک رقم را بدون تغییر بقیه ترکیب ژنتیکی آن کاهش می‌دهد *مایک* (Micke, 1999). استراتژی اصلی در اصلاح بر پایه جهش ایجاد سریع واریته‌های گیاهی سازگار با عملکرد بالاتر و کیفیت بهتر می‌باشد *آلووالیا و همکاران*، *ایلیرجانا* و همکاران (Ahloowalia *et al.*, 2004؛ Ilirjana *et al.*, 2007). در گونه‌های دیپلوئید حداکثر تغییرپذیری ژنتیکی در نسل M_2 حاصل می‌شود و موتانت‌های انتخابی برای صفات مختلف در نسل M_3 تثبیت می‌شوند و پایداری فنوتیپی نشان می‌دهند *بوجیو* و همکاران (Bugio *et al.*, 2007).

در بین موتاژن‌های شیمیایی، استفاده از EMS رایج‌تر است *احمدی‌خواه* (Ahmadikhah, 2012). عوامل آلکیلی مانند اتیل‌متان‌سولفونات (EMS) یک گروه متیل یا اتیل به کربن شماره ۷ باز گوانین در رشته DNA اضافه می‌کنند و اگر باز گوانینی که تحت تأثیر عوامل آلکیلی قرار گرفته از رشته DNA جدا نشود، در جفت شدن همانند آدنین عمل نموده، می‌تواند با تیمین یا سیتوزین جفت شود و سبب می‌شود GC به AT تبدیل شود *راکشیت* و همکاران (Rakshit *et al.*, 2010). EMS به‌عنوان عامل ایجاد جهش نقطه‌ای باعث پیدایش دامنه گسترده‌ای از آلل‌های جهش‌یافته، مانند از دست دادن کارکرد ژن، به‌دست آوردن کارکرد جدید، تغییر کارکرد ژن و تولید جهش یافته‌های جدید با خصوصیات ویژه می‌گردد. این درحالی است که جهش‌های حاصل از پرتوهای گاما، اغلب باعث حذف و اضافه شدن یک رشته نوکلئوتیدی و بروز جهش‌یافته‌های با کارکرد از دست رفته ژن‌ها می‌شوند *انباراسان* و همکاران (Anbarasan *et al.*, 2013)، *احمدی‌خواه* (2012).

از اتیل‌متان‌سولفونات 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 کردند *محمد و همکاران* (Mohamad *et al.*, 2009). در مطالعه‌ای بذرهای سورگوم با دوزهای مختلفی از اشعه گاما پرتوتابی شدند که اشعه گاما به‌طور 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 به‌دست آمد. در فصل خشک این لاین‌ها بیوماس و عملکرد دانه بالاتری نسبت به واریته مادری دورا و واریته شاهد محلی تولید کردند *هومن و سیهونو* (Human and Sihono, 2010).

برتری ویژه اصلاح موتاسیونی در گیاهان، امکان به‌دست آوردن تنوع ژنتیکی کافی و نیز بهبود گیاهان با تکثیر رویشی می‌باشد؛ به‌خصوص زمانی‌که هدف به‌نژادگر تغییر یک یا تعداد کمی خصوصیت از یک واریته تجاری الیت باشد *شو و لاگودا* (2007). یکی از موفقیت‌ها در اصلاح برنج از طریق جهش‌زایی در پاکستان، ایجاد ۴ واریته پر عملکرد و با کیفیت بهتر بوده است که نمونه آن رقم برنج "شاداب"، از تیمار بذرهای رقم IR6 با موتاژن شیمیایی اتیل‌متان‌سولفونات (EMS) بوده است. پتانسیل عملکرد این رقم موتانت ۷ تن در هکتار و کیفیت دانه خوبی دارد *بوجیو* و همکاران (Bughio *et al.*, 2007). *خادمیان* و همکاران (Khademian *et al.*, 2004) از دو موتاژن فیزیکی (اشعه) و شیمیایی (EMS) برای اعمال تیمارهای موتاژنی در سه رقم برنج ایرانی استفاده کردند که در هر سه جمعیت موتانت ارتفاع بوته نسبت به شاهد کاهش معنی‌داری نشان داد. همچنین، تعداد پنجه و تعداد دانه در خوشه که از اجزای اصلی عملکرد می‌باشند در اکثر موارد افزایش یافتند و میزان عملکرد دانه به جز چند مورد استثناء در همه موارد افزایش بسیار زیادی نسبت به شاهد داشت. جهش‌های القایی منبع ارزشمندی برای ایجاد تنوع لازم در برنامه‌های بهبود ژنتیکی گیاهان می‌باشند و جهش‌های کوچک یا بزرگ غیرکشنده در ژنوم گیاهان اهمیت بالایی در اصلاح گیاهان دارند *وازلین* (Vasline, 2013). اتیل‌متان‌سولفونات (EMS) به‌عنوان عامل ایجاد جهش‌های نقطه‌ای، باعث پیدایش دامنه گسترده‌ای از آلل‌های موتانت، مانند از دست دادن کارکرد، به‌دست آوردن کارکرد یا بروز صفات، تغییر در کارکرد و تولید موتانت‌های جدید با خصوصیات ویژه می‌گردد *پنمتسا و کوک* (Penmetsa and Cook, 2000). با استفاده از جهش‌های القایی واریته‌های پرعملکرد و یا واریته‌هایی با خصوصیات کیفی و کمّی بهتر در گیاهان مختلف ایجاد شده است. برای مثال، در مطالعه (Jana and Roy, 2004) موتانت‌های مطلوب بهتر از شاهد، از نظر تعداد دانه پر در خوشه و طول خوشه بعد از تیمار با EMS ایجاد شدند.

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 نماید. ازجمله مزایای آن می‌توان به داشتن چندین لوکوس چندشکل، قابل کاربرد با تعداد زیادی نمونه و هزینه پایین اشاره کرد احمدی‌خواه (2012). علاوه‌بر آن ISSRها نسبت به نشانگرهای RAPD قابلیت تکرارپذیری بالاتری به دلیل دمای اتصال بالاتر دارند و هزینه آنالیز ISSR نسبت به هزینه برخی نشانگرها مانند AFLP پایین‌تر است *ردی و همکاران* (Reddy *et al.*, 2002). 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 *چقامیرزا* و همکاران، *سالیمت* و همکاران (Cheghamirza *et al.*, 2004; Salimath *et al.*, 1995).

هدف این تحقیق، بررسی تنوع ژنتیکی تعدادی لاین موتانت انتخابی و مقایسه آنها با رقم مادری پس از جهش‌زایی با موتاژن اتیل‌متان‌سولفونات (EMS) با استفاده از نشانگرهای ISSR بود.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

مواد گیاهی استفاده شده در این تحقیق شامل رقم برنج ندا (به‌عنوان رقم مادری شاهد) و ۱۸ لاین موتانت حاصل از جهش‌زایی این رقم با محلول ۰/۱ درصد موتاژن اتیل‌متان‌سولفونات (EMS) بودند *شجاعیان* (Shojaeian, 2012). بر اساس مشاهده تغییر فاحش در صفات مورفولوژیکی (شامل تعداد پنجه، زمان خوشه‌دهی، ارتفاع بوته و عملکرد تک‌بوته) در نسل M_2 در لاین‌های موتانت نسبت به رقم مادری، تعدادی از بهترین موتانت‌ها جهت ارزیابی مولکولی با نشانگرهای ISSR انتخاب شدند که در ۴ دسته مندرج در جدول ۱ قرار گرفتند. برای صفت تعداد پنجه ۲ موتانت، برای ارتفاع بوته ۴ موتانت، برای زودرسی ۶ موتانت و برای عملکرد بوته نیز ۶ موتانت برتر (در مجموع ۱۸ لاین موتانت) انتخاب شده و مورد بررسی قرار گرفتند. مشخصات لاین‌های موتانت به‌همراه رقم مادری در جدول ۱ آورده شده است.

جدول ۱: لاین‌های موتانت مورد استفاده در این تحقیق که در ۴ دسته مورفولوژیکی قرار داشتند

Table 1: Mutant lines used in this research which placed into 4 morphological classes

دسته Class	نماد Symbol	خصوصیت Trait	میانگین Mean	میانگین موتانت‌ها Mutants mean	دسته Class	نماد Symbol	خصوصیت Trait	میانگین Mean	میانگین موتانت‌ها Mutants mean
لاین‌های پاکوتاه Dwarf lines	Plh1	ارتفاع بوته Plant height	75.1	77.6**	لاین‌های پرپنجه High-tillering lines	Til1	تعداد پنجه Tiller number	30.3	28.7**
	Plh2	ارتفاع بوته Plant heigh	77.5			Til2	تعداد پنجه Tiller number	27.2	
	Plh3	ارتفاع بوته Plant heigh	78.0			ندا Neda	تعداد پنجه Tiller number	21.7	
	Plh4	ارتفاع بوته Plant heigh	79.8						
	ندا Neda	ارتفاع بوته Plant heigh	105			Y1	عملکرد بوته Plant yield	68.3	65.7**
لاین‌های زودرس Early-mature lines	Hd1	زمان خوشه‌دهی Heading time	96	95.8**	لاین‌های پرعملکرد High-yielding lines	Y2	عملکرد بوته Plant yield	63.2	
	Hd2	زمان خوشه‌دهی Heading time	96			Y3	عملکرد بوته Plant yield	64.8	
	Hd3	زمان خوشه‌دهی Heading time	96			Y4	عملکرد بوته Plant yield	65.2	
	Hd4	زمان خوشه‌دهی Heading time	95			Y5	عملکرد بوته Plant yield	69.0	
	Hd5	زمان خوشه‌دهی Heading time	96			Y6	عملکرد بوته Plant yield	64.0	
	Hd6	زمان خوشه‌دهی Heading time	96			ندا Neda	عملکرد بوته Plant yield	45.0	
	ندا Neda	زمان خوشه‌دهی Heading time	104						

** نشان‌دهنده معنی‌دار بودن تفاوت میانگین موتانت‌ها با میانگین رقم مادری (ندا) در سطح ۱ درصد می‌باشد

** indicates significance of mean differences of mutants with mean of original cultivar (cv. Neda) at 1% level

استخراج DNA و تکثیر با نشانگرهای ISSR

DNA ژنومی کل از برگ‌های جوان با استفاده از روش تغییر یافته CTAB احمدی‌خواه (Ahmadikhah, 2009) استخراج شد. برای تعیین کمّیت و کیفیت DNA استخراجی از الکتروفورز ژل‌آگارز ۱٪ در بافر TBE استفاده شد. برای بررسی سطح تنوع مولکولی حاصل از تیمار جهش از ۱۰ آغازگر ISSR استفاده شد (جدول ۲). 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 پیکوگرم بر میکرولیتر) بود. محصولات حاصل از تکثیر به وسیله الکتروفورز در ژل آگارز ۱/۵ درصد حاوی اتیدیوم بروماید (۰/۵ میکروگرم بر میکرولیتر) در بافر TBE تفکیک شدند. برای مشخص کردن طول قطعات از نشانگر اندازه مولکولی ladder100 bp استفاده شد. عکسبرداری از ژل‌ها با استفاده از دستگاه ژل داکیومنت انجام شد.

پروفیل حرارتی PCR برای آغازگرهای ISSR به‌صورت زیر بود: ۹۴°C به‌مدت ۵ دقیقه؛ ۳۵ چرخه در ۹۴°C به‌مدت ۳۰ ثانیه، ۴۸°C به‌مدت ۳۵ ثانیه، ۷۲°C به‌مدت ۹۰ ثانیه؛ و سرانجام ۷۲°C به‌مدت ۵ دقیقه.

جدول ۲: آغازگرهای ISSR استفاده شده در این تحقیق

Table 2: ISSR primers used in this research

ردیف No.	نام آغازگر Primer name	توالی `۳-`۵ Sequence (5`-3`)	ردیف No.	نام آغازگر Primer name	توالی `۳-`۵ Sequence (5`-3`)
1	ISSR1	(GA)7-RG	6	ISSR6	(AC)8-YG
2	ISSR2	(CA)7-YC	7	ISSR7	(TG)8-RC
3	ISSR3	(AG)8-T	8	ISSR8	(AT)7-RC
4	ISSR4	(AG)8-YC	9	ISSR9	(CA)7-YG
5	ISSR5	(GT)8-YC	10	ISSR10	(CA)8-RC

تجزیه داده‌ها

برای مقایسه میانگین صفات لاین‌های موتانت انتخابی با رقم مادری از آزمون t در نرم‌افزار SPSS *کینیر و کولین* (Kinnear and Colin, 2000) استفاده شد. باندهای حاصل از تکثیر با نشانگرهای ISSR به صورت ۱ (وجود باند) و ۰ (عدم‌وجود باند) امتیازدهی شدند، سپس با استفاده از نرم‌افزار Pop Gene32 به همکاران (Yeh *et al.*, 1999) میزان چندشکلی، مقدار اطلاعات چندشکلی، فاصله ژنی نئی و ... محاسبه گردید. میزان چندشکلی با تقسیم تعداد لوکوس‌های چندشکل بر تعداد کل لوکوس‌ها محاسبه گردید. مقدار اطلاعات نسبی نشانگرهای مولکولی از طریق محاسبه مقدار اطلاعات چندشکلی (PIC) طبق رابطه ۱ محاسبه گردید *آندرسون* و همکاران (Anderson *et al.*, 1993).

رابطه (۱) $PIC = 1 - \sum_j^n Pij^2$

که در آن Pij فراوانی آلل j برای نشانگر i می‌باشد که برای همه آلل‌ها (n آلل) جمع زده می‌شود. فاصله ژنتیکی نئی (Nei, 1978) بین ژنوتیپ‌ها (H) از رابطه ۲ محاسبه شد.

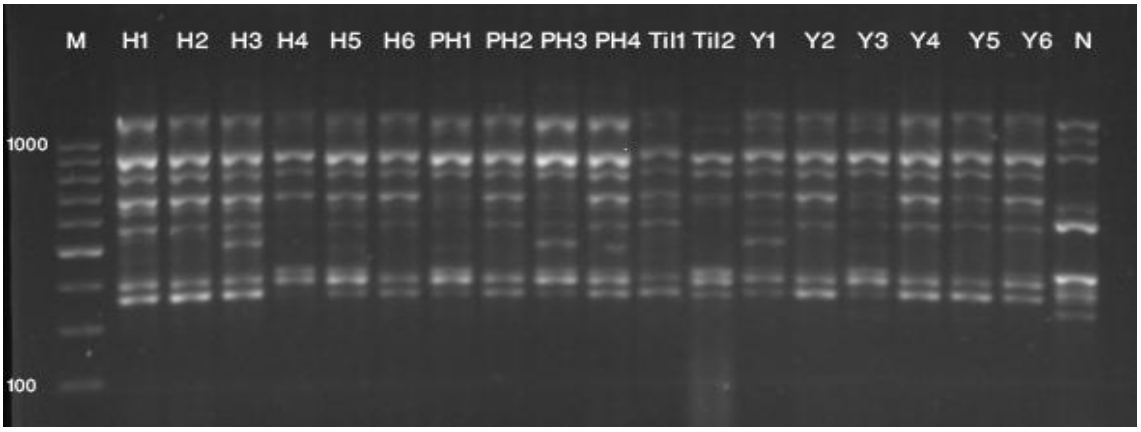
رابطه (۲) $H= 1 - [Nx,y/(Nx,+Ny)]$

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.

نتایج

در این مطالعه الگوی تکثیر DNAی ۱۸ لاین موتانت انتخابی برنج به‌همراه رقم مادری (ندا) با آغازگرهای ISSR مورد بررسی قرار گرفت. از ۱۰ آغازگر مورد استفاده، ۸ آغازگر به‌خوبی DNAی ژنوتیپ‌های مخلف را تکثیر کردند که نمونه‌ای از الگوی الکتروفورزی یکی از آغازگرها در شکل ۱ آورده شده است. تعداد نوار تولید شده به ازای هر آغازگر به‌طور متوسط ۸/۴ و تعداد کل نوارهای تولید شده ۶۷ عدد بود که ۳۶ نوار (۵۳/۷ درصد) چندشکلی بین ژنوتیپ‌ها را نشان دادند (جدول ۳). بیشترین و کمترین نوار تولید شده به ترتیب مربوط به آغازگرهای ISSR3 و ISSR2 و بیشترین و کمترین نوار چندشکل به‌ترتیب مربوط به آغازگرهای ISSR7 و ISSR 6 بود.

آغازگرهای ISSR2 و ISSR1 به‌ترتیب بیشترین و کمترین مقدار اطلاعات چندشکلی (PIC) را نشان داند.



شکل ۱: الگوی الکتروفورزی آغازگر ISSR3 در موتانت‌های انتخابی و رقم مادری ندا. M: نشانگر اندازه مولکولی (100 bp ladder)؛ H1 تا H6: شش لاین موتانت زودرس؛ PH1 تا PH4: چهار لاین موتانت پاکوتاه؛ Til1 و Til2: دو لاین موتانت پرپنجه؛ Y1 تا Y6: شش لاین موتانت پرعملکرد؛ N: رقم مادری ندا

Fig. 1: Electrophoretic pattern of ISSR primer in selected mutants and original cultivar Neda. M: molecular size marker (100 bp ladder); H1 to H6: six early-maturing mutants; PH1 to PH4: four dwarf mutants; Til1 and Til2: two high-tillering mutants; Y1 to Y6: six high-yielding mutants; N: original cultivar Neda

جدول ۳: برخی شاخص‌های به‌دست آمده با آغازگرهای مورد استفاده در تحقیق

Table 3: Some calculated indices by primers used in the study

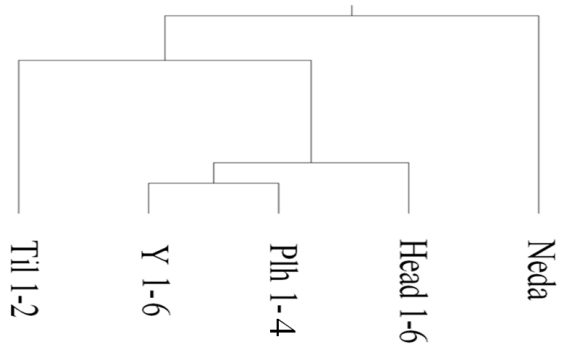
ردیف No.	نام آغازگر Primer name	تعداد کل نوارها Total band no.	نوارهای چندشکل Polymorphic bands	درصد نوارهای چندشکل Polymorphic bands (%)	PIC
1	ISSR1	8	3	37.5	10.5
2	ISSR2	6	3	50.0	40.5
3	ISSR3	11	8	72.7	24.5
4	ISSR4	8	3	37.5	31.1
5	ISSR6	7	3	42.9	21.1
6	ISSR7	10	8	80.0	18.7
7	ISSR9	9	4	44.4	12.7
8	ISSR10	8	4	50.0	35.5
	میانگین Mean	8.4	4.5	53.7	24.3

متوسط ضریب تنوع ژنی نئی در جمعیت مورد مطالعه، ۱۴/۱ درصد به‌دست آمد. بیشترین شباهت به رقم مادری (۸۶/۸ درصد) مربوط به دسته موتانت‌های پرعملکرد (Y 1-6) و کمترین شباهت (۷۶/۷ درصد) مربوط به دسته موتانت‌های پرپنجه (Til 1-2) بود. تجزیه خوشه‌ای با روش UPGMA، رقم مادری را در یک گروه و ۴ دسته لاین‌های موتانت را در گروه دیگری قرار داد (شکل ۲).

حال برای آگاهی از سطح تغییرات جهشی در جهت ایجاد تفاوت‌های مولکولی در لاین‌های موتانت، این تغییرات را به تفکیک هر صفت برای موتانت‌های انتخابی مورد بررسی قرار می‌دهیم.

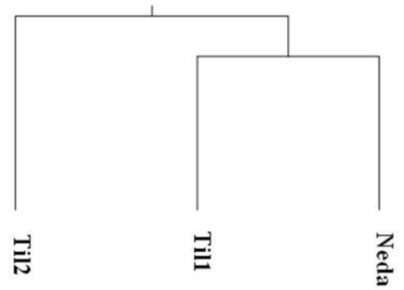
موتانت‌های انتخابی برای تعداد پنجه بیشتر

دو موتانت MT152 و MT-A (Til1 و Til2) که دارای بیشترین تعداد پنجه بودند به‌همراه رقم مادری ندا با ۸ آغازگر ISSR برررسی شدند که ۷ آغازگر (شامل ISSR1-4، ISSR7، ISSR9 و ISSR10) توانستند چندشکلی میان ژنوتیپ‌ها را آشکار سازند. در مجموع ۶۰ لوکوس تکثیر گردید که ۲۴ لوکوس (۴۰ درصد) چندشکلی نشان دادند. متوسط ضریب تنوع ژنی نئی، ۱۷/۸ درصد به‌دست آمد. موتانت MT152 شباهت بیشتری (در حدود ۷۷ درصد) با رقم مادری داشت و موتانت MT-A تنها حدود ۶۷ درصد به رقم مادری شباهت داشت، از این‌رو با روش تجزیه خوشه‌ای در گروه جداگانه‌ای نسبت به رقم مادری قرار گرفت (شکل ۳).



شکل ۲: گروه‌بندی کلی ۴ دسته موتانت‌های انتخابی به همراه رقم مادری براساس نشانگرهای ISSR. Head1-6: شش لاین موتانت زودرس؛ Plh1-4: چهار لاین موتانت پاکوتاه؛ Y1-6: شش لاین موتانت پرعملکرد؛ Til1-2: دو لاین موتانت پرپنجه

Fig. 2: Grouping of 4 classes of the selected mutants along with the original cultivar based on ISSR markers. Head 1-6: six early-maturing mutants; Plh1-4: four dwarf mutants; Til1-2: two high-tillering mutants; Y1-6: six high-yielding mutants



شکل ۳: گروه‌بندی لاین‌های موتانت پر پنجه به‌همراه رقم مادری با روش UPGMA. MT152=Til1 و MT-A=Til2

Fig. 3: Grouping of high-tillering mutants along with the original cultivar using UPGMA method. Til1=MT152 and Til2=MT-A

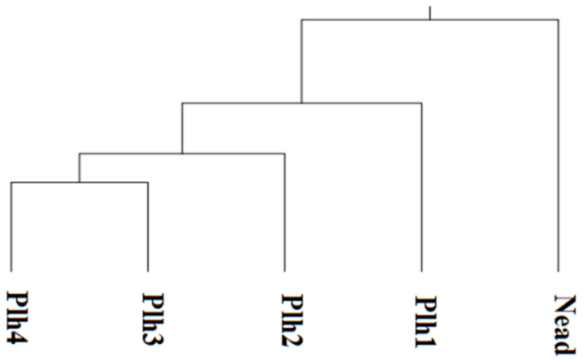
موتانت‌های انتخابی برای پاکوتاهی

چهار لاین موتانت (Plh 1-4) که متحمل بیشترین کاهش ارتفاع بوته نسبت به رقم مادری شده بودند، با ۸ آغازگر ISSR بررسی شدند که ۶ آغازگر (شامل ISSR1-4، ISSR6 و ISSR10) توانستند چندشکلی میان ژنوتیپ‌ها را آشکار نمایند. در مجموع ۴۸ لوکوس تکثیر گردید که ۲۱ لوکوس (۴۳/۸ درصد) چندشکلی نشان دادند. متوسط ضریب تنوع ژنی نئی، ۱۶/۱ درصد به‌دست آمد. موتانت شماره Plh3 شباهت بیشتری (در حدود ۷۹/۳ درصد) با رقم مادری داشت و موتانت‌های Plh1 و Plh2 تنها حدود ۶۸/۸ درصد با رقم مادری شباهت داشتند. تجزیه خوشه‌ای، رقم مادری را در یک گروه و همه لاین‌های موتانت را در گروه جداگانه‌ای قرار داد (شکل ۴).

موتانت‌های انتخابی برای زودرسی

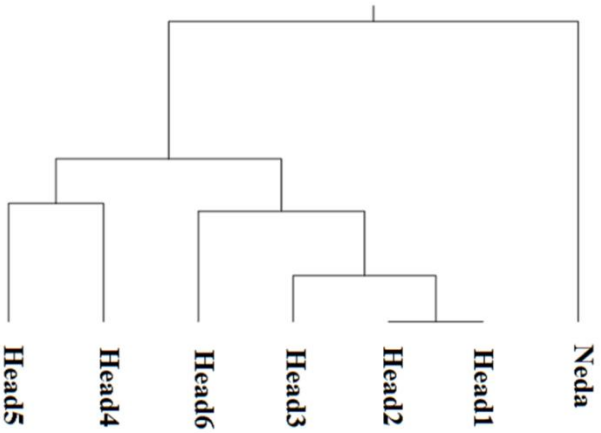
شش لاین موتانت (Head 1-6) که متحمل بیشترین کاهش در زمان خوشه‌دهی نسبت به رقم مادری شده بودند، با ۸ آغازگر ISSR بررسی شدند که ۷ آغازگر (شامل ISSR1-4، ISSR6، ISSR7 و ISSR10) توانستند چندشکلی میان ژنوتیپ‌ها را آشکار نمایند. در مجموع ۵۸ لوکوس تکثیر گردید که ۲۰

لوکوس (۳۴/۵ درصد) چندشکلی نشان دادند. متوسط ضریب تنوع ژنی نئی، ۱۰/۵ درصد به‌دست آمد. موتانت Head5 شباهت بیشتری (در حدود ۸۲/۸ درصد) با رقم مادری داشت و موتانت Head3 تنها حدود ۷۵/۹ درصد با رقم مادری شباهت داشت. تجزیه خوشه‌ای، رقم مادری را در یک گروه و همه لاین‌های موتانت را در گروه دیگری قرار داد که خود به دو زیرگروه عمده تقسیم شدند (زیرگروه اول شامل دو لاین موتانت Head4 و Head5 و زیرگروه دوم شامل سایر لاین‌های موتانت زودرس؛ شکل ۵).



شکل ۴: گروه‌بندی لاین‌های موتانت پاکوتاه به‌همراه رقم مادری با روش UPGMA. Plh1=MT22؛ Plh2=MT58؛ Plh3=MT198 و Plh4=MT24

Fig. 4: Grouping of dwarf mutants along with the original cultivar using UPGMA method. Plh1=MT22; Plh2=MT58; Plh3=MT198 and Plh4=MT24



شکل ۵: گروه‌بندی لاین‌های موتانت زودرس به همراه رقم مادری با روش UPGMA. Head1=MT193؛ Head2=MT192؛ Head3=MT133؛ Head4=MT80؛ Head5=MT72 و Head6=MT57

Fig. 5: Grouping of early-maturing mutants along with the original cultivar using UPGMA method. Head1=MT193; Head2=MT192; Head3=MT133; Head4=MT80; Head5=MT72 and Head6=MT57

موتانت‌های انتخابی برای عملکرد بالا

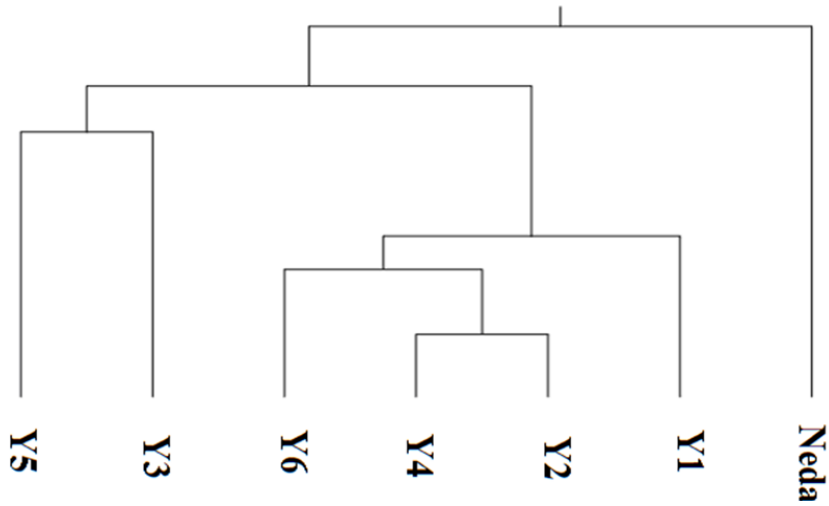
شش لاین موتانت (Y1-6) که دارای بیشترین افزایش عملکرد تک بوته نسبت به رقم مادری بودند، با ۸ آغازگر ISSR بررسی شدند که ۷ آغازگر (شامل ISSR1-4، ISSR7، ISSR9 و ISSR10) توانستند چندشکلی میان ژنوتیپ‌ها را آشکار نمایند. در مجموع ۵۷ لوکوس تکثیر گردید که ۲۱ لوکوس (۳۶/۸ درصد) چندشکلی نشان دادند. متوسط ضریب تنوع ژنی نئی، ۱۲/۵ درصد به‌دست آمد. موتانت شماره Y6 شباهت بیشتری (در حدود ۸۶ درصد) با رقم مادری داشت و موتانت‌های Y3 و Y5 تنها حدود ۷۷/۲ درصد با رقم مادری شباهت داشتند. تجزیه خوشه‌ای با روش UPGMA، رقم مادری را در یک گروه و لاین‌های موتانت را در گروه دیگری قرار داد که خود آن‌ها به دو زیرگروه تقسیم شدند (زیرگروه اول شامل Y3 و Y5 و زیرگروه دوم شامل چهار لاین موتانت دیگر؛ شکل ۶).

بحث

استفاده از جهش در بسیاری از کشورها از دیرباز متداول بوده و از آن جهت ایجاد تنوع ژنتیکی و مواد ژنتیکی جدید با هدف

بهبود خواص کمّی و کیفی مختلف سود جسته‌اند. با استفاده از تکنیک جهش لاین‌های زودرس در سویا، *ناصری تفتی* و همکاران (Naseri Tafti *et al.*, 2003)، برنج، *شهاتا* و همکاران (Shehata *et al.*, 2009)، گندم، *خان* و همکاران (Khan *et al.*, 2001) و موز *نگوئیرا* و همکاران (Nogueira *et al.*, 2010) ایجاد شده‌اند.

تغییر صفات کمّی و کیفی در گیاهان از طریق جهش در سایر تحقیقات نیز گزارش شده است *جابین و میرزا*، *بن‌جواد طالبی* و همکاران، *پتنایک* و همکاران (Jabeen and Mirza, 2002; Benjavad Talebi *et al.*, 2012; Patnaik *et al.*, 2006). *فتوکیان* و همکاران (Fotookian and Esfahani, 2001) توانستند با القاء جهش به وسیله پرتوتابی در واریته برنج دم‌سیاه لاین‌های پاکوتاهی را به‌دست آورند که ۶۰ سانتی‌متر کوتاه‌تر از شاهد بوده و تعداد پنجه‌های آن‌ها نیز به طور معنی-داری بیشتر از شاهد بود. این نتایج نشان‌دهنده قابلیت استفاده از جهش جهت ایجاد تنوع در ارقام زراعی گیاهان می‌باشد که در مطالعات دیگر نیز گزارش شده است. در مطالعه‌ای با استفاده از اشعه گاما لاین‌های مقاوم به خوابیدگی و پرمحصول در رقم برنج موسی طارم ایجاد گردید مجد و همکاران (Majd *et al.*, 2002). *شهاتا* و همکاران (2009) با استفاده از جهش روی برنج جاسمین مصری، تنوع خوبی در بین لاین‌های موتانت برای خصوصیات کیفی و عطر و طعم دانه مشاهده کردند. در مطالعه *ونگسواد* و همکاران (Wongsawad *et al.*, 2005) در تیمار ۰/۹ درصد EMS، موتانت‌هایی با برگ‌های طویل‌تر از رقم مادری تولید شد. لاین‌های بدون کرک *لی و لی* (Lee and Lee, 2002) و موتانت‌های کلروفیلی شامل آلبینو، سبز سیر و گزانتا *ردی و ردی* (Reddi and Reddi, 1984) و نیز حذف ریشک در گندم *سینگ و بالیان* (Singh and Balyan, 2009) در اثر جهش ایجاد شدند.



شکل ۶: گروه‌بندی لاین‌های موتانت پرعملکرد به‌همراه رقم مادری با روش UPGMA. MT44=Y1؛ MT115=Y2؛ MT87=Y3؛ MT120=Y4؛ MT199=Y5 و MT100=Y6

Fig. 6: Grouping of high-yielding mutants along with the original cultivar using UPGMA method. Y1=MT44; Y2=MT115; Y3=MT87; Y4=MT120; Y5=MT199 and Y6=MT100

استفاده از ۸ آغازگر ISSR توانست تولید ۶۷ نشانگر با ۵۳/۷ درصد چندشکلی میان رقم مادری و لاین‌های موتانت نماید. چندشکلی‌های آشکار شده توسط نشانگرها و میزان شاخص 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 ۱۴/۱ درصد محاسبه شد که نشان‌دهنده تأثیر تیمار جهش‌زا در جهت ایجاد تغییرات کافی در سطح DNA برای ایجاد تنوع مطلوب جهت اِعمال انتخاب توسط به‌نژادگر می‌باشد *بن‌جواد طالبی* و همکاران (2012)، *پتنایک* و همکاران (2006). 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 گرفته است و در مطالعات مربوطه ارقام مادری به خوبی از لاین‌های موتانت متمایز گشته‌اند. برای مثال، *شهزاد* و همکاران (Shehzad *et al.*, 2011) با استفاده از نشانگر SSR و *هوانگ* و همکاران (Hoang *et al.*, 2009) با نشانگرهای

RAPD-PCR و RAMP-PCR، *میری* و همکاران (Miri *et al.*, 2009) با نشانگرهای RAPD و OPJ، و *نگوئیرا* و همکاران (2011) با نشانگرهای ISSR توانستند تفاوت ژنتیکی بین ارقام مادری و لاین‌های موتانت انتخابی را آشکار نمایند. براساس نتایج این تحقیق، می‌توان نتیجه‌گیری کرد که تکنیک جهش برای ایجاد تنوع ژنتیکی در برنج مطلوب می‌باشد و از نشانگرهای ISSR می‌توان برای جداسازی و شناسایی لاین‌های موتانت در جمعیت‌های حاصل از جهش در برنج استفاده کرد.

منابع:

جهت مطالعه منابع به صفحه‌های ۱۳-۱۴ متن انگلیسی مراجعه شود.