القاء تنوع ژنتیکی در ارقام برنج طارم محلی و هاشمی با استفاده از اتیل متان سولفونات و بررسی تنوع ایجاد شده از طریق نشانگرهای SSR

محمد سیه‌چهره، غفار کیانی* و سیدکمال کاظمی‌تبار

ایران، ساری، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی

تاریخ دریافت: ۹۷/۴/۲۴ تاریخ پذیرش: ۹۷/۱۰/۲۵

چکیده

اصلاح موتاسیونی یکی از ابزارهای مؤثر برای بهبود صفات زراعی در گیاهان می‌باشد. هدف از این مطالعه، القاء جهش بااستفاده از موتاژن شیمیایی اتیل متان سولفونات (EMS) در ارقام محلی برنج به‌منظور بهبود صفات زراعی آنها و ارزیابی تنوع ژنتیکی ایجاد شده در نسل M_2 بوده است. دراین آزمایش اثر غلظت‌های مختلف EMS (صفر، ۰/۱۷ ۰/۳۵ و ۰/۵۱ درصد) بر ارقام طارم محلی و طارم هاشمی مورد بررسی قرارگرفت. ژنوتیپ‌های برتر ازنظر وضعیت فنوتیپی در نسل M_2 گزینش و یادداشت‌برداری صفات مهم زراعی در آنها صورت گرفت. ارزیابی تنوع القایی ایجاد شده در سطح فنوتیپی با استفاده از صفات زراعی و نیز در سطح مولکولی با استفاده از ۱۲ نشانگر مولکولی SSR صورت گرفت.EMS به‌خوبی توانست باعث کاهش معنی‌داری در میانگین صفاتی همانند ارتفاع و تعداد دانه پوک و همچنین باعث افزایش وزن ۱۰۰ دانه و طول خوشه گردد. موتانت شماره ۱۳ (حاصل از طارم محلی) دارای ویژگی‌های ممتاز زراعی نظیر ارتفاع کم (۱۴۷ سانتی‌متر)، تعداد پنجه بالا (۳۷)، طول خوشه بلندتر (۲۹/۳ سانتی‌متر) و تعداد دانه پر بیشتر (۱۵۸) نسبت شاهد مربوطه بود. همچنین، موتانت های با کدهای ۳ و ۱۰ (حاصل از رقم طارم هاشمی) نیز جزء برترین لاین ها بودند و ارتفاع این لاین ها به ترتیب برابر ۱۴۴ و ۱۳۹ سانتی‌متر می‌باشد. نتایج داده‌های مولکولی حاکی از ایجاد تنوع ژنتیکی در لاین‌های انتخابی موتانت در قیاس با شاهدهای مربوطه بود.

واژه‌های کلیدی: برنج محلی، موتاژن EMS، نشانگر SSR، صفات زراعی، تغییرات ژنتیکی

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۱۱۱۵۸۸۶۷۸، پست الکترونیکی: gh.kiani@sanru.ac.ir , ghkiani@gmail.com

مقدمه

تنوع ژنتیکی اساس و پایه کار اصلاح نباتات است (۹). یک به‌نژادگر گیاهی در صورتی می‌تواند شانس موفقیت زیادی در برنامه اصلاحی خود داشته باشد که تنوع و شانس انتخاب مواد مناسب برای او موجود باشد. اصلاح به کمک جهش در گیاهان زراعی ابزار مؤثری برای به‌نژادگران گیاهی مخصوصاً در محصولاتی که تنوع ژنتیکی محدودی دارند، می‌باشد. به‌طورکلی هدف از ایجاد جهش مصنوعی، تغییر یک یا چند ژن نزدیک به هم و شکستن همبستگی و افزایش کراسینگ‌اور بین ژنهای مطلوب و نامطلوب می‌باشد (۱۱ و ۲۰). راهبرد اصلی در اصلاح موتاسیونی، ایجاد سریع ارقام گیاهی سازگار و با عملکرد بالاتر و کیفیت بهتر می‌باشد (۴). اتیل متان سولفونات با جرم مولی ۱۲۴/۱۶ g/mol یکی از موتاژن‌های شیمیایی است که کاربرد وسیعی در اصلاح نباتات دارد. اتیل متان سولفونات (EMS) به‌عنوان ماده شیمیایی جهش‌زا باعث تبدیل بازهای G و C به بازهای A و T (ترانزیشن) می‌شود که این ممکن است در زمان ترجمه باعث تغییر نوع پروتئین شود (۲۱). روش‌های مختلفی جهت ارزیابی تنوع ژنتیکی درون جوامع گیاهی وجود دارد. ارزیابی صفات فنوتیپی گیاه همواره در

برنامه‌های اصلاحی جهت برآورد تنوع و گروه‌بندی ارقام مورداستفاده بوده است، ولی با توجه به اینکه اندازه‌گیری صفات فنوتیپی برای تعداد زیادی نمونه، نیاز به‌صرف وقت و هزینه زیادی دارد و هم‌چنین ارزیابی فنوتیپی به دلیل اثر محیط بر بیان ژن، ممکن است روش قابل‌اعتمادی برای تعیین تفاوت‌های ژنتیکی نباشد. به همین دلیل، برای بررسی تنوع ژنتیکی از نشانگرهای مولکولی به‌طور گسترده استفاده می‌شود (۱۸). امروزه نشانگرهای ریز ماهواره به دلیل سهولت در کاربرد و تفسیر نتایج و همچنین هم بارز بودن، در بررسی تنوع ژنتیکی و تهیه نقشه ژنتیکی به‌طور گسترده به کار می‌رود (۱۴).

در مطالعه‌ای (۱۳) بذور برنج رقم Katy تحت تیمار EMS با غلظت ۱/۲، ۰/۸ و ۰/۴ درصد قرارگرفته بودند بیشترین درصد ناهنجاری در بیوسنتز کلروفیل در گیاهانی با دز ۱/۲ درصد تیمار شده بودند ایجاد شد و همچنین موتانت برنج Katy Lmm1 مقاومت بیشتری به بلاست و شیت بلایت نشان داد. در مطالعه‌ای دیگر (۱) برنج رقم ندا با استفاده از EMS مورد جهش قرارگرفت و ۱۸ لاین موتانت حاصل از آن را با استفاده از آغازگرهای ISSR مورد ارزیابی قرار گرفتند. ۵۳/۷ درصد از آغازگرها چندشکلی را در بین ژنوتیپ‌ها نشان دادند. با استفاده از اشعه گاما ارقام محلی برنج ایرانی شامل سنگ طارم، طارم هاشمی و نعمت مورد جهش قرارگرفت. بوته‌ها در نسل M_2 بوسیله صفات مورفولوژیکی و نشانگر مولکولیISJ (intron-exon splice junctions) مورد ارزیابی قرار گرفتند (۵). برنج مهمترین گیاه زراعی دنیا و غذای بیش از نیمی از مردم جهان است (۱۶).

ارقام طارم محلی و طارم هاشمی به دلیل کیفیت بالایی که دارند در بین کشاورزان منطقه محبوبیت و جایگاه خاصی در کشت و زرع دارند ولی یکی از مهمترین مشکلاتی که می‌شود برای آنها ذکر کرد ارتفاع بلند آنها می‌باشد که باعث ورس و کاهش عملکرد می‌گردد. هدف از این تحقیق القاء تغییرات ژنتیکی با استفاده از موتاژن شیمیایی اتیل متان سولفونات (EMS) در ارقام محلی برنج برای اصلاح صفات زراعی و ارزیابی تنوع ایجاد شده در نسل M_2 می‌باشد.

مواد و روشها

این تحقیق طی سال‌های ۱۳۹۲ و ۱۳۹۳ در دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری انجام شد. برای انجام این تحقیق از بذور ارقام طارم محلی و طارم هاشمی که از پژوهشکده ژنتیک دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی ساری تهیه گردید استفاده شد. به‌منظور القاء جهش از تیمارهای ۰/۱۷، ۰/۳۵ و ۰/۵۱ درصد موتاژن شیمیایی اتیل متان سولفونات (EMS) برای هر رقم استفاده شد. ابتدا بذور مربوط به هر رقم به مدت ۲۴ ساعت خیسانده شدند. سپس بذور خیسانده شده به مدت ۱۸ ساعت در محلول‌های ۰/۱۷ ٪، ۰/۳۵ ٪ و ۰/۵۱ ٪ EMS به‌منظور القاء جهش قرارگرفتند. پس‌ازآن، بذور تیمار شده ۳ مرتبه و هر بار به مدت ۵ دقیقه در آب مقطر شستشو شدند و بعدازآن نیز مجدداً سه مرتبه و هر نوبت ۲۰ دقیقه در آب مقطر قرار گرفتند تا شستشو گردند و درنهایت به مدت ۲ ساعت زیر شیر آب جاری شستشو شدند (۷). بذور تیمار شده به همراه شاهد هر رقم در مزرعه مورد کشت قرار گرفتند. با جوانه‌زنی بذور مورد تیمار، نسل اول جهش (M_1) تولید گردید. عملیات زراعی لازم از قبیل آبیاری، وجین، مبارزه با آفات و امراض طبق روش‌های معمول انجام گرفت. پس از رسیدگی کامل بوته‌ها نسل اول جهش (M_1)، برداشت برای هر دز هر رقم به‌طور کامل ولی به‌صورت تک بوته و جداگانه انجام گرفت. در سال دوم و جهت تولید نسل دوم جهش (M_2)، بذور جمع‌آوری شده M_1 مربوط به هر رقم به‌طور جداگانه در خزانه کشت شدند. پس از یک ماه و رشد کافی بوته‌ها، ژنوتیپ‌های هر رقم به‌طور جداگانه در زمین اصلی به همراه شاهدشان کشت گردیدند. کلیه عملیات زراعی لازم همانند سال اول انجام شد. پس از

خروج کامل خوشه‌ها و قبل از رسیدگی کامل آنها، ژنوتیپ‌های M_2 مربوط به هر رقم که در مقایسه با شاهدشان دارای ارتفاع کمتر و زودرسی بودند، مورد انتخاب قرارگرفتند. پس از انتخاب اولیه ژنوتیپ‌های M_2، ارتفاع (cm)، تعداد پنجه و طول خوشه (cm) آنها به همراه شاهد هر رقم در مزرعه اندازه‌گیری شد. پس از رسیدگی کامل بوته‌ها و برداشت خوشه‌های ژنوتیپ‌های انتخاب‌شده، صفات زراعی دیگر همانند تعداد کل دانه، تعداد دانه پر، تعداد دانه پوک، طول دانه (mm)، عرض دانه (mm) و وزن ۱۰۰ دانه (gr) در آزمایشگاه مورد اندازه‌گیری قرار گرفت که برای این منظور از هر بوته انتخاب شده سه خوشه نماینده شدند.

به‌منظور ارزیابی تنوع ژنتیکی ایجاد شده، از ژنوتیپ‌های M_2 انتخاب شده نمونه برگی گرفته شد. نمونه‌های برگی با استفاده از ازت مایع پودر شده و با استفاده از روش CTAB استخراج DNA صورت گرفت (۱۷). کمیت و کیفیت DNA استخراج‌شده با استفاده از ژل آگارز ۰/۸ درصد و دستگاه اسپکتروفتومتر Eppendorf biophotometer مورد سنجش قرارگرفت. واکنش زنجیره‌ای PCR در حجم ۱۲/۵ میکرولیتر بااستفاده از دستگاه ترموسایکلر TECHNE TC-512 انجام شد. در این تحقیق از ۱۲ پرایمر نشانگرهای SSR (جدول ۱) برای ارزیابی تنوع ژنتیکی ایجاد شده استفاده شده است (۲).

جدول ۱- آغازگرهای SSR مورد استفاده جهت ارزیابی تنوع ژنتیکی موتانت های برنج

پرایمر Primer	شماره کروموزوم No. Chromosome	Forward	Reverse	دمای اتصال Annealing Temperature
RM1	1	GCGAAAACACAATGCAAAAA	GCGTTGGTTGGACCTGAC	54
RM207	2	CCATTCGTGAGAAGATCTGA	CACCTCATCCTCGTAACGCC	65
RM7	3	TTCGCCATGAAGTCTCTCG	CCTCCCATCATTTCGTTGTT	55
RM119	4	CATCCCCCTGCTGCTGCTGCTG	CGCCGGATGTGTGGGACTAGCG	67
RM516	5	GTTTCCTGCATGCTTGGAAC	ATGTGATTGTATCAGGCTCG	55
RM121	6	ACCGTCGCCTTCCACTTTCCCC	TTCGGGGTTGCCGGTGATGTTG	55
RM11	7	TCTCCTCTTCCCCCGATC	ATAGCGGGCGAGGCTTAG	56.5
RM152	8	GAAACCACCACACCTCACCG	CCGTAGACCTTCTTGAAGTAG	60
RM215	9	CAAAATGGAGCAGCAAGAGC	TGAGCACCTCCTTCTCTGTAG	55.5
RM171	10	AACGCGAGGACACGTACTTAC	ACGAGATACGTACGCCTTTG	56
RM441	11	ACACCAGAGAGAGAGAGAGAGAG	TCTGCAACGGCTGATAGATG	55
RM491	12	ACATGATGCGTAGCGAGTTG	CTCTCCCTTCCCAATTCCTC	55

برای انجام PCR، از ۱/۵ میکرولیتر DNA ۵۰ نانوگرم بر میکرولیتر، ۱/۲۵ میکرولیتر بافر PCR با غلظت ۱۰ برابر (10X)، ۱/۲۵ میکرومولار $MgCl_2$، ۰/۳ میکرومولار dNTPs، ۰/۳۵ میکرولیتر از آغازگرهای رو به جلو و ۰/۳۵ میکرولیتر از آغازگرهای رو به عقب (۱۰ پیکومول)، ۰/۲ میکرولیتر آنزیم تک پلیمراز (یک واحد آنزیمی) استفاده شد. چرخه دمایی PCR جهت تکثیر DNA با نشانگرهای SSR شامل ۴ دقیقه دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد برای واسرشت‌سازی اولیه DNA، ۳۵ چرخه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، ۵۴-۶۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵۰ ثانیه، ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه و سرانجام ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌عنوان بسط نهایی به مدت ۷ دقیقه بوده است. پس از انجام PCR از ژل آگارز ۲ درصد برای تفکیک باندهای تولید شده استفاده شد. پس از انجام الکتروفورز، از اتیدیوم برماید برای رنگ‌آمیزی استفاده شد. نهایتاً برای مشاهده الگوی باندی با استفاده از دستگاه ژل‌داک Slite200W عکس‌برداری صورت گرفت. امتیازدهی براساس وجود (۱) و عدم وجود باند (۰) انجام گرفت. دراین پژوهش مقایسات موتانت ها با شاهد از طریق t-student و مقایسات میانگین از طریق LSD نسبت به شاهد انجام گردید. به‌منظور تجزیه‌وتحلیل داده‌ها مورفولوژیکی و مولکولی به ترتیب از نرم‌افزارهای SPSS و NTSYS استفاده شد.

نتایج

تجزیه‌وتحلیل داده‌های مورفولوژیکی: ارتفاع زیاد ارقام طارم محلی و طارم هاشمی و عملکرد نسبتاً پایین، از مهمترین صفات نامطلوب آنها می‌باشد. مقایسات میانگین نشان داد که استفاده از EMS تأثیر بسزایی در کاهش ارتفاع ژنوتیپ‌های M_2 رقم طارم محلی نسبت به شاهد آن داشته است (جدول ۲). در بررسی حاضر، EMS باعث افزایش معنی‌دار وزن ۱۰۰ دانه رقم طارم محلی در دز ۰/۵۱ درصد شده است ولی در دیگر دزها اثر معنی‌داری نداشته است. با اعمال EMS، صفات تعداد دانه پوک و تعداد پنجه در هیچ سطحی و در هیچ دزی نسبت شاهدشان معنی‌دار نشده است (جدول ۲). طول خوشه در دز ۰/۵۱ درصد نسبت به شاهد دارای افزایش بسیار معنی‌داری بود.

چون انتخاب بر مبنای ارتفاع کمتر نسبت به شاهد بوده است، همانند طارم محلی کاهش ارتفاع در ژنوتیپ‌های حاصل از طارم هاشمی در هر سه دز بسیار معنی‌دار گردیده است. اعمال EMS نتوانسته باعث افزایش و یا کاهش معنی‌دار میانگین وزن ۱۰۰ دانه در ژنوتیپ‌های طارم هاشمی شود. کاهش تعداد دانه پوک در تمامی دزهای ژنوتیپ‌های رقم طارم هاشمی معنی‌دار گردیده است. اعمال EMS باعث کاهش میانگین طول خوشه در ژنوتیپ‌های رقم طارم هاشمی شده به طوریکه این کاهش در دز ۰/۳۵ درصد معنی‌دار شده است. همانند طول خوشه، تعداد پنجه نیز کاهش پیدا کرده است و این کاهش در دز ۰/۵۱ درصد معنی‌دار بوده است.

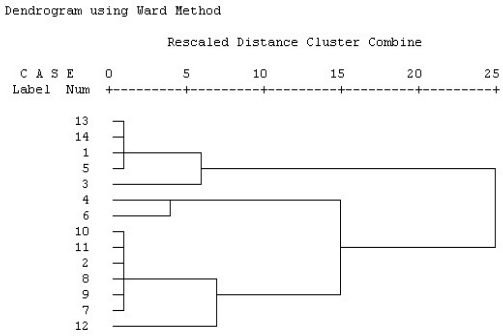
اثر EMS بر روی صفت طول خوشه در ژنوتیپ‌های دو رقم متفاوت بوده است که ممکن است به دلیل ماهیت تصادفی بودن جهش‌ها و یا به دلیل ساختار ژنتیکی دو رقم باشد.

صفات زراعی ژنوتیپ‌های انتخابی ارقام طارم محلی و طارم هاشمی در نسل M_2 به همراه شاهد در جداول ۳ و ۴ نشان داده شده است. در بین ژنوتیپ‌های M_2 مربوط به طارم محلی، کمترین ارتفاع و بیشترین طول خوشه متعلق به ژنوتیپ شماره ۱۴ می‌باشد. ژنوتیپ‌های شماره ۴، ۵، ۱۲ و ۱۳ نسبت به شاهد طارم محلی دارای پنجه بسیار بیشتری می‌باشند. ژنوتیپ شماره ۱۳ در رقم طارم محلی بیشترین تعداد کل دانه و همچنین بیشترین تعداد دانه پر نسبت به دیگر ژنوتیپ‌ها و شاهد را دارا می‌باشد. ژنوتیپ شماره ۸ در رقم طارم محلی با داشتن وزن ۱۰۰ دانه‌ای معادل ۲/۸۳ گرم بیشترین وزن دانه را در بین دیگر ژنوتیپ‌ها داشت.

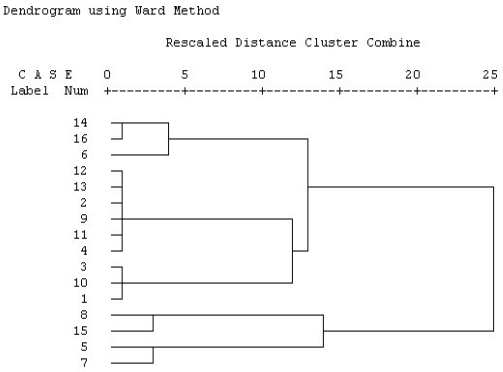
در بین ژنوتیپ‌های M_2 مربوط به طارم هاشمی، ژنوتیپ شماره ۵ دارای کمترین ارتفاع می‌باشد. در رقم طارم هاشمی تنها ژنوتیپ ۸ نسبت به شاهد دارای پنجه بیشتری می‌باشد. ژنوتیپ شماره ۲ در طارم هاشمی دارای طول خوشه بلندتری بود. ژنوتیپ شماره ۴ در طارم هاشمی، هم دارای تعداد کل دانه بیشتری نسبت به دیگر ژنوتیپ‌ها و شاهد است و هم دارای بیشترین تعداد دانه پر می‌باشد. ژنوتیپ شماره ۱۶ با داشتن وزن ۱۰۰ دانه‌ای معادل ۳ گرم بیشترین وزن دانه را در بین دیگر ژنوتیپ‌ها داشت.

تجزیه‌وتحلیل داده‌های مولکولی: شکل‌های ۱ و ۲ نتایج گروه‌بندی ژنوتیپ‌های M_2 ارقام طارم محلی و طارم هاشمی را با استفاده از داده‌های مولکولی SSR نشان می‌دهند. در هریک از این اشکال ژنوتیپ شماره ۱ شاهد هر رقم می‌باشد. موتانت های حاصل از رقم طارم محلی در دو گروه اصلی متمایز شده‌اند بطوریکه موتانت‌های با کدهای ۳، ۵، ۱۳ و ۱۴ در یک خوشه به همراه شاهد مربوطه قرارگرفته‌اند که حاکی از شباهت ژنتیکی بیشتر آنها با والد مربوطه می‌باشد. از بین این لاین‌ها، موتانت شماره ۱۳ دارای ویژگی‌های ممتاز زراعی نظیر ارتفاع کم (۱۴۷ سانتی‌متر)، تعداد پنجه بالا (۳۷)، طول خوشه بلندتر (۲۹/۳ سانتی‌متر) و تعداد دانه پر بیشتر (۱۵۸) نسبت شاهد مربوطه می‌باشد (جدول ۳). موتانت‌های حاصل از رقم

طارم هاشمی در دو گروه اصلی و هرکدام به ترتیب با سه و دو زیرگروه از همدیگر متمایز شدند، بطوریکه موتانت‌های با کدهای ۳و ۱۰ در یک خوشه به همراه شاهد مربوطه قرارگرفته‌اند که حاکی از شباهت ژنتیکی بیشتر آنها با والد مربوطه می‌باشد. ارتفاع این لاین‌ها به ترتیب برابر ۱۴۴ و ۱۳۹ سانتی‌متر می‌باشد.



شکل ۱- گروه‌بندی حاصل از تجزیه خوشه‌ای لاین های موتانت حاصل از رقم طارم محلی به همراه شاهد (کد ۱) با استفاده از داده‌های حاصل از نشانگرهای SSR



شکل ۲- گروه‌بندی حاصل از تجزیه خوشه‌ای لاین های موتانت حاصل از رقم طارم هاشمی به همراه شاهد (کد ۱) با استفاده از داده‌های حاصل از نشانگرهای SSR

جدول ۲- مقایسه میانگین صفات در نسل M_2 با استفاده از آزمون LSD نسبت به شاهد

صفات	طارم محلی Tarom mahalli				طارم هاشمی Tarom hashemi			
	شاهد control	0.17%	0.35%	0.51%	شاهد control	0.17%	0.35%	0.51%
ارتفاع Height	148.25*	146**	147.4**	161.33	140.5**	137.5**	146.33**	152.4
ضریب تغییرات CV	5.68	1.25	1.70	1.49	3.22	5.64	1.71	1.41
وزن ۱۰۰ دانه 100-grain weight	2.57*	2.3^{ns}	2.43^{ns}	2.34	2.69^{ns}	2.48^{ns}	2.41^{ns}	2.54
ضریب تغییرات CV	1.23	16.6	4.09	1.26	7.54	6.45	10.49	0.73
تعداد دانه پوک No. non-filled grains	5.25^{ns}	28^{ns}	13.6^{ns}	9.8	6.8*	4.3**	3.6**	12.2
ضریب تغییرات CV	9.52	97.72	77.22	32.39	51.82	48.5	41.65	10.91
طول خوشه Panicle length	29.3**	27.2^{ns}	26.42^{ns}	25.92	27.38^{ns}	25.85*	26.96^{ns}	28.6
ضریب تغییرات CV	1.21	2.7	4.19	0.5	4.31	8.23	7.97	2.06
تعداد پنجه Tiller number	25.25^{ns}	18^{ns}	27.4^{ns}	27.4	19.37**	23.75^{ns}	22^{ns}	31.6
ضریب تغییرات CV	56.22	31.75	50.34	3.7	34.22	33.92	27.64	5.1

جدول ۳- صفات اندازه‌گیری شده موتانت‌های انتخابی در نسل M_2 در رقم طارم محلی

ژنوتیپ Genotype	ارتفاع (cm) height	پنجه tiller	طول خوشه Panicle length (cm)	تعداد کل دانه Total grain	تعداد دانه پوک No. of unfilled grain/panicle	تعداد دانه پر No. of filled grain/panicle	قطر دانه Grain width (mm)	طول دانه Grain length (mm)	وزن ۱۰۰ دانه 100-grain weight (gr)
Control (1)	161	27	25.9	137	9	128	1.91	10.1	2.34
2	143	20	27.6	120	25	95	1.95	10.54	2.54
3	149	13	26.1	112	4	108	1.98	10.59	2.4
4	148	39	24.8	162	25	147	1.87	9.91	2.3
5	149	45	27.3	133	8	125	1.79	10.15	2.52
6	148	20	26.3	139	6	133	1.84	9.57	2.39
7	144	25	27.5	132	40	92	1.8	9.3	2.09
8	147	12	28.1	138	5	133	1.97	10.13	2.83
9	145	15	26.6	158	61	97	1.9	9.34	2.33
10	148	20	26.6	133	6	127	1.77	8.45	1.96
11	160	21	29	135	5	130	1.8	9.1	2.53
12	146	36	29.1	130	6	124	1.83	9.92	2.6
13	147	37	29.3	163	5	158	1.91	9.95	2.54
14	140	7	29.8	122	5	117	1.99	9.8	2.57

جدول ۴- صفات اندازه‌گیری شده موتانت‌های انتخابی در نسل M_2 در قم طارم هاشمی

ژنوتیپ Genotype	ارتفاع height (cm)	پنجه tiller	طول خوشه Panicle length (cm)	تعداد کل دانه Total grain	تعداد دانه پوک No. of unfilled grain/panicle	تعداد دانه پر No. of filled grain/panicle	قطر دانه Grain width (mm)	طول دانه Grain length (mm)	وزن ۱۰۰ دانه 100-grain weight (gr)
Control	152.4	31	28.6	124	12	112	1.98	10.3	2.54
2	146	15	29.1	101	4	97	1.88	10.75	2.7
3	144	26	27	94	2	92	1.95	9.93	2.22
4	149	25	24.8	168	5	163	2.01	9.46	2.32
5	128	21	27.5	95	2	93	2	10.21	2.6
6	141	23	26	105	4	101	1.84	9.57	2.48
7	135	16	22.8	115	4	111	2.05	9.84	2.6
8	146	35	27.1	100	7	93	2.04	10.49	2.26
9	146	18	28.5	139	14	125	1.88	9.28	2.45
10	139	27	25	91	5	84	1.87	9.35	2.8
11	148	22	28	120	10	110	1.81	10.33	2.45
12	138	13	27.6	116	4	112	1.92	10.23	2.86
13	138	22	26.8	118	6	112	1.93	9.68	2.55
14	134	16	27.1	127	3	124	2.06	9.85	2.75
15	140	9	28.8	117	7	110	1.99	10.05	2.66
16	141	28	27.3	120	6	114	1.92	10.16	3.02

بحث و نتیجه‌گیری

تغییرات مورفولوژیکی مانند کاهش ارتفاع و افزایش وزن ۱۰۰ دانه، کاهش تعداد دانه پوک و افزایش طول خوشه در اصلاح برنج اهمیت بسیار زیادی دارند. انتخاب اولیه و اصلی دراین پژوهش بر مبنای زودرسی و ارتفاع کمتر بوده است. خوابیدگی ساقه یکی از مشکلات مهم در محصول برنج است که معمولاً باعث کاهش کمی و کیفی عملکرد شده و برداشت محصول را نیز با مشکل مواجه می‌کند (۱۲). خوابیدگی ساقه در برنج معمولاً در نتیجه انحراف ساقه از حالت عمودی و حتی قرارگرفتن افقی آن روی زمین، علاوه برکندی در عملیات برداشت، می‌تواند عملکرد را تا ۸۰ درصد کاهش دهد (۱۹). همانطور که در جدول ۲ آمده است کاهش ارتفاع ژنوتیپ‌های M_2 هر رقم در تمامی دزها بسیار معنی‌دار شده است. تغییرات مهمی چون کاهش ارتفاع و مقاومت به خوابیدگی اثر مستقیمی برافزایش کودپذیری گیاه دارد و افزایش کودپذیری موجب افزایش عملکرد نیز می‌شود. تغییر هریک از این صفات می‌تواند به تنهایی منجر به افزایش یا کاهش عملکرد که هدف نهایی این‌گونه بررسی‌ها است بشود. طبق مطالعاتی که (۳) با استفاده از موتاژن شیمیایی EMS روی برنج رقم طارم

محلی انجام دادند، گزارش کردند که ارتفاع بوته‌های جهش‌یافته نسبت به شاهد کمتر بوده است (۸). رقم باسماتی ۳۷۰ را تحت تاثیر دزهای مختلف اشعه گاما قراردادند که آنها نیز کاهش ارتفاع بوته را در مطالعات خود گزارش کرده‌اند.

در مطالعه‌ی (۶) که از اشعه گاما برای ایجاد جهش استفاده گردید، هم افزایش وزن ۱۰۰ دانه و هم کاهش آن را گزارش گردیده است. با استفاده از EMS (۳) و با استفاده از گاما (۱۰) ارقام برنج را مورد جهش قراردادند. آنها نیز افزایش تعداد دانه پوک را نسبت به شاهد گزارش کردند. افزایش تعداد دانه پوک در تحقیق (۳) بسیار کمتر از تحقیق (۱۰) بوده است. این امر می‌تواند به دلیل استفاده از ارقام مختلف و نوع موتاژن باشد. در گزارش‌هایی که (۲۳) ارائه کردند هم افزایش و هم کاهش طول خوشه مشاهده شده است درحالیکه (۱۳) تفاوت معنی‌داری در طول خوشه مشاهده نکردند.

در مطالعه حاضر جهش باعث کاهش تعداد پنجه شده است. این نتیجه با نتایج (۱۸) مطابقت دارد ولی با نتایج (۱۰) که از اشعه گاما برای اعمال جهش استفاده کردند، مغایرت دارد. آنها افزایش تعداد پنجه را در مطالعه‌ی خود مشاهده کردند (۱۵). با استفاده از EMS رقم Nagina22 را اعمال جهش کردند. آنها هم افزایش و هم کاهش تعداد پنجه را مشاهده کردند.

در بین موتانت‌های مورد مطالعه حاصل از طارم محلی، موتانت شماره ۱۳ دارای ویژگی‌های ممتاز زراعی نظیر ارتفاع کم (۱۴۷ سانتی‌متر)، تعداد پنجه بالا (۳۷)، طول خوشه بلندتر (۲۹/۳ سانتی‌متر) و تعداد دانه پر بیشتر (۱۵۸) نسبت شاهد مربوطه می‌باشد (جدول ۳). از بین موتانت های حاصل از رقم طارم هاشمی، موتانت‌های با کدهای ۳ و ۱۰ برترین لاین‌ها بودند و ارتفاع این لاین‌ها به ترتیب برابر ۱۴۴ و ۱۳۹ سانتی‌متر می‌باشد. سایر مطالعات اصلاحی روی این لاین‌های انتخابی در نسل‌های بالاتر در جریان می‌باشد. باتوجه به اینکه EMS باعث ایجاد جهش‌های نقطه‌ای می‌شود و تجزیه کلاستر داده‌های مولکولی نشان داد که ژنوتیپ‌های با صفات مطلوب موردنظر (ارتفاع، زودرسی، طول خوشه و...) دارای شباهت ژنتیکی زیادی با شاهد هر رقم می‌باشند، از این‌رو انتخاب این لاین‌ها همراه با ادامه ارزیابی‌ها می‌تواند نویدبخش اصلاح و تولید لاین‌های معطر جدید و مقاوم به خوابیدگی در آینده نزدیک در ایران می‌باشند. همچنین نتایج حاصل از این تحقیق، کارایی EMS را در اصلاح موتاسیونی ارقام محلی برنج به‌خوبی نشان می‌دهد.

سپاسگزاری

از دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری به خاطر فراهم آوردن امکانات تحقیق سپاسگزاری می‌شود.

منابع

۱- احمدی خواه، ا.، شجاعیان، ه.، پهلوانی، م. ه.، و نیری پسند، ل.، ۱۳۹۳. شناسایی لاین های موتانت متحمل به شوری در برنج و انگشت‌نگاری آنها با نشانگر ISSR ، ژنتیک نوین، شماره ۹ (۳)، صفحات ۲۹۹-۳۱۲.

۲- اله‌قلی‌پور، م.، فرشادفر، ع.، و ربیعی، ب.، ۱۳۹۲. ارزیابی تنوع مولکولی ژنوتیپ‌های برنج (*Oryza sativa* L.) با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره همبسته با خصوصیات زراعی و فیزیکوشیمیایی دانه، مجله علوم زراعی ایران، شماره ۱۵(۴)، صفحات ۳۳۷-۳۵۴.

۳- مجیدی، ز.، بابائیان جلودار، غ. ع.، رنجبر، ن. ع.، و باقری، ن. ع.، ۱۳۹۲. مطالعه تنوع ایجاد شده به‌وسیله اتیل متان سولفونات و سدیم آزید روی رقم برنج طارم محلی، پژوهشنامه اصلاح گیاهان زراعی ۵ (۱۲)، صفحات ۴۹-۶۲.

4- Ahloowalia, B. S., Maluszynski, M., and Nichterlein, K., 2004. Global impact of mutation-derived varieties. Euphytica, 135, PP: 187-204.

5- Babaei, A., Nematzadeh, G. H., and Hashemi, H., 2011. An evaluation of genetic differentiation in rice mutants using semi-random markers and morphological characteristics. Australian Journal of Crop Science, 5(13), PP: 1715-1722.

6- Baloch, A. W., Soomro, A. M., Mustafa, G., Bughio, M. S., and Bughio, H. R., 1999. Mutagenesis for reduced plant height and high grain yield in Jajai77, an aromatic rice (*Oryza sativa* L.) variety. Pakistan Journal of Botany, 31 (2), PP: 469-474.

7- Bradley, J. T., Cooper, J., Tai, T. H., Colowit, P., Greene, E. A., and Comai, L., 2007. Discovery of chemically induced mutations in rice by TILLING. BioMedCentral (BMC Plant Biology), 7, 19 p.

8- Bughio, H. R., Asad, M. A., Odhano, I. A., Bughio, M. S., Khan, M. A, and Mastoi, N. N., 2007. Improvement of grain yield in rice variety Basmati-370 (*Oryza sativa* L.), through mutagenesis. Pakistan Journal of Botany, 39 (7), PP: 2463-2466.

9- De, R. N., Reddy, J. N., Suriava, A. V., and Mohanty, K. K., 1992. Genetic divergence in early rice under two situations. Indian J. Genet, 52, PP: 225-229.

10- Haris, A., and Jusoff, K., 2013. Gamma ray radiation mutant rice on local aged dwarf. Middle-East Journal of Scientific Research, 15(8), PP: 1160-1164.

11- Hase, Y., Akita, Y., Kitamura, S., Narumi, I., and Tanaka, A., 2012. Development of an efficient mutagenesis technique using ion beams: Toward more controlled mutation breeding. Plant Biotechnology, 29, PP: 193-200.

12- Ibrahim, S., and Degwy, E. I., 2013. Mutation induced genetic variability in rice (*Oryza sativa* L.). International Journal of Agriculture and Crop Science, 5(23), PP: 2789-2794.

13- Jia, Y., Xie, J., and Rutger, J. N., 2006. Development and characterization of Katy deletion mutant populations for functional genomics of host-parasite interactions and rice improvement. Plant Mutation Report, 1(1), PP: 43-47.

14- Mackill, D. J., 2007. Molecular markers and marker-assisted selection in rice. Springer, 2, PP: 147-168.

15- Mohapatra, T., Robin, S., Sarla, N., Sheshashayee, M., Singh, A. K., and Sharma, R. P., 2014. EMS Induced Mutants of Upland Rice Variety Nagina22: Generation and Characterization. Proceedings of the Indian National Science Academy, 80, PP: 163-172.

16- Montalvan, R., and Ando, A., 1998. Effect of gamma-radiation and sodium azide on quantitative character in rice. Genetic and Molecular Biology, 21(1), PP: 244-251.

17- Murray, M. G., and Thompson, W. F., 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant, Nucleic Acids Research, 8, PP: 4321-4325.

18- Ronald, L., and Indra, K., 2001. NA-Based Markers in Plants. Springer, 6 p.

19- Setter, T. L., Laureles, E. V., and Mazaredo, A. M., 1997. Lodging reduces yield of rice by self-shading and reduction in canopy photosynthesis. Field Crops Research, 49, PP: 95-106.

20- Shu, Q. Y., and Lagoda, P. J. L., 2007. Mutation techniques for gene discovery and crop improvement. Molecular Plant Breeding, 2, PP: 193-195.

21 - Wattoo, K., Aslam, S., Shab, G, and Shabir, M., 2012. Ethyl methane sulphonate (EMS) induced mutagenic attempts to create genetic variability in Basmati rice. Journal of Plant Breeding and Crop Science, 4(7), PP: 101-105.

Induction of genetic variation in Tarom mahalli and Hashemi rice varieties using ethyl methane sulfonate and assessment of induced variation through SSR markers

Siahchehreh M. Kiani G. and Kazemitabar S.K.

Dept. of Biotechnology and Plant Breeding, Sari University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Sari, I.R. of Iran.

Abstract

Mutational breeding is an effective tool for improvement of agronomic traits in crops. The purpose of this study, mutation induction in local rice varieties using chemical mutagen ethyl methane sulfonate (EMS) to improve their agronomic traits and evaluating genetic variation at M_2 generation. In this study the effect of EMS concentrations (0, 0.17, 0.35 and 0.51 percent) was studied on Tarom Mahalli and Tarom Hashemi local varieties. Superior genotypes were selected in M_2 generation based on phenotypic status as well as their important agronomic traits were recorded. Evaluation of induced genetic variation was done using agronomic traits as well as 12 SSR (Simple Sequence Repeat) markers at phenotypic and molecular levels, respectively. The EMS effectively reduced significantly average of traits like plant height as well as non-filled grains and increased the mean values for 100-grain weight and panicle length. Mutant no. 13 (derived from Tarom mahalli) had superior agronomic characteristics like lower height (147 cm), more tiller number (37), panicle length (29.3 cm) and filled grains (158) in comparison with its control. Also, mutants no. 3 and 10 (derived from Tarom Hashemi) identified as superior lines and their height were 144 and 139 cm, respectively. Results of the study showed successful induction of genetic variation in mutant lines comparing with respective controls.

Key words: Local rice, EMS mutagen, SSR marker, agronomic traits, genetic variation