"مجله علوم زراعی ایران"
جلد بیستم، شماره ٤، زمستان ۱۳۹۷

ارزیابی تنوع و اعتبار سنجی نشانگرهای ریزماهواره پیوسته با تحمل تنش شوری در ژنوتیپ‌های برنج (*Oryza sativa* L.)

Assessment of diversity and validation of microsatellite markesr associated with salinity tolerance in rice (*Oryza sativa* L.) genotypes

سیده آمنه روحانی[۱]، علی مومنی[۲]، علی اکبر عبادی[۳] و بهزاد قره یاضی[۴]

چکیده

روحانی، س. آ.، ع. مومنی، ع. ا. عبادی و ب. قره یاضی. ۱۳۹۷. ارزیابی تنوع و اعتبار سنجی نشانگرهای ریزماهواره پیوسته با تحمل تنش شوری در ژنوتیپ‌های برنج (*Oryza sativa* L.). **مجله علوم زراعی ایران. ۲۰(٤): ۳٦۰-۳٤٤.**

این تحقیق به منظور اعتبارسنجی تعداد ۱۰ نشانگر ریزماهواره پیوسته با ژن‌ها و جایگاه‌های مختلف تحمل شوری از جمله ژن *Saltol* که به فاصله صفر تا هشت سانتی‌مورگان از جایگاه‌های ژنی قرار داشته و ارزیابی تنوع آللی این ژن‌ها در ۵۹ ژنوتیپ برنج طی سال‌های۹۰-۱۳۸۸ در موسسه تحقیقات برنج کشور انجام شد. در این آزمایش ارزیابی برای تعدادی از صفات مورفولوژیک مهم مرتبط با تحمل تنش شوری شامل نمره تحمل شوری، ارتفاع گیاهچه، وزن خشک ریشه، وزن خشک اندام هوایی و محتوای آب نسبی برگ انجام شد. ژنوتیپ‌های برنج در مرحله گیاهچه‌ای در دو تیمار ۰/۹ دسی‌زیمنس بر متر (بدون تنش) و ۱۲ دسی‌زیمنس بر متر (تنش شوری) مورد ارزیابی قرار گرفتند. غربال مولکولی با استفاده از ۱۰ نشانگر مورد استفاده در ژنوتیپ‌های برنج مورد مطالعه، ٦۰ آلل را در ژنوتیپ‌های برنج ایجاد نمود. نتایج حاصل از تجزیه رگرسیون لجستیک نشان داد که از ۱۰ جایگاه ریزماهواره پیوسته، چهار نشانگر توجیه‌کننده تغییرات در واکنش به شوری به‌ترتیب RM315 برای ارتفاع گیاهچه، RM223 برای وزن خشک ریشه و ارتفاع گیاهچه، RM3627 برای وزن خشک ریشه، ارتفاع گیاهچه و محتوای آب نسبی برگ و RM8094 برای برای وزن خشک ریشه و محتوای آب نسبی برگ بودند. بر اساس تجزیه خوشه‌ای براساس داده‌های مولکولی با استفاده از ضریب Yule و روش UPGMA، ژنوتیپ‌های برنج به پنج گروه تقسیم شدند. با توجه به اینکه سه نشانگر پیوسته شناسایی شده (RM8094 ، RM3627 و RM315) روی کروموزوم یک واقع شده و با ژن *Saltol* نیز پیوسته هستند، می‌توان از آنها در شناسایی ژنوتیپ‌های متحمل و حساس برنج استفاده کرده و ژنوتیپ‌های واجد این جایگاه‌ها را در برنامه‌های اصلاح برای تحمل به شوری مورد استفاده قرار داد.

واژه‌های کلیدی: برنج، تنش شوری، تنوع ژنتیکی، ریزماهواره و نشانگرهای پیوسته.

تاریخ دریافت: ۱۳۹٦/۱۲/۰۸ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۱۰/۱۲ این مقاله مستخرج از پایان نامه کارشناسی ارشد نگارنده اول و پروژه تحقیقاتی برنامه چالش جهانی آب و غذا (CPWF, PN:7) موسسه تحقیقات برنج کشور می‌باشد

۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی دانشگاه زنجان.

۲- دانشیار موسسه تحقیقات برنج کشور- معاونت مازندران، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی. (مکاتبه کننده) (پست الکترونیک: amoumeni@areeo.ac.ir)

۳- استادیار موسسه تحقیقات برنج کشور- رشت، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی.

۴- استاد پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی.

[Downloaded from agrobreedjournal.ir on 2026-11-25]

[DOR: 20.1001.1.15625540.1397.20.4.6.5]

مقدمه

بیش از سه چهارم از سطح زمین با آب شور پوشیده شده است و نمک بخش زیادی از اراضی جهان را متاثر ساخته است. در حال حاضر حدود ۸۰۰ میلیون هکتار از اراضی دنیا (حدود ۶ درصد از کل اراضی دنیا) تحت تأثیر شوری هستند و از این مقدار حدود ۲۰ درصد از اراضی زراعی (۴۵ میلیون هکتار) که تحت آبیاری هستند، شور می‌باشند (Ali *et al.*, 2014). از مجموع ۱۶۵ میلیون هکتار سطح کشور ایران، حدود ۳۴ میلیون هکتار که ۴/۱ میلیون هکتار آن فاریاب هستند، تحت تأثیر شوری قرار داشته و یا شور هستند (Fathi and Rezaei, 2013).

برنج یکی از محصولات عمده غذایی در دنیا و از جمله ایران است که در ابتدای مراحل رشد (گیاهچه‌ای) و مرحله زایشی بسیار حساس به تنش شوری می‌باشد (Suriya-aruroj *et al.*, 2004). در حال حاضر، تنش شوری دومین چالش بزرگ در خاک‌های مناطق زیر کشت برنج در دنیا به شمار می‌رود (Gregorio *et al.*, 2002). در ایران و در استان‌های برنج‌خیز شمالی مقادیر زیادی از اراضی شالیزاری شور شده و یا در معرض شوری قرار دارند، به‌طوری که مناطق وسیعی از مرکز تا شرق استان مازندران واقع در اراضی ساحلی دارای آب نسبتا شور تا خیلی شور و یا دارای خاک شور هستند. در استان گیلان نیز در نواحی مختلف از جمله حاشیه تالاب انزلی، اراضی ساحلی و همچنین مناطقی از پیربازار و نواحی اطراف (رشت) دچار شوری خاک و آب هستند و در بخشی از این مناطق زمین‌های زراعی بدون کشت رها شده است (Moumeni *et al.*, 2009). بدین جهت بهبود تحمل شوری در برنج یکی از راهکارهای اساسی بشمار می‌رود که می‌تواند به افزایش تولید این محصول در مناطق تحت تاثیر شوری کمک کرده و باعث شود تا در آینده تولید برنج در مناطق تحت تنش شوری، که در حال حاضر قابلیت کشت را ندارند، گسترش یابد (Suriya-aruroj *et al.*, 2004). وجود تنوع در ژرم‌پلاسم برنج و بهره‌گیری از تنوعات مفید و وارد کردن آن به ژنوتیپ‌های حساس رایج، می‌تواند به حفظ و پایداری تولید کمک کند (Moumeni and Shokri-Vahed, 2013). در این راستا آزمایشات متعددی جهت درک میزان تنوع در سطح مولکولی و در رابطه با ژن‌های شناخته شده مسئول تحمل تنش شوری و همچنین اعتبارسنجی آنها در ژرم پلاسم برنج صورت گرفته است. در آزمایشی توسط محمدی‌نژاد و همکاران (Mohammadi-Nejad *et al.*, 2008) در رابطه با برآورد تنوع نشانگرهای ریزماهواره پیوسته با مکان ژنی کمی (QTL) به نام *Saltol* در مرحله گیاهچه‌ای در ۳۶ ژنوتیپ برنج و در شرایط تنش شوری (۱۲ دسی زیمنس بر متر) مشخص شد که در جمعیت حداقل ۳ آلل برای نشانگر RM10702 تا ۱۴ آلل برای نشانگر RM8094 تولید شده و نقش کروموزوم یک در تحمل تنش شوری نیز به اثبات رسید. قبلاً نیز گزارش شده بود که مکان ژنی کمی (QTL) بزرگ‌اثر *Saltol* روی کروموزوم شماره یک و در مجاورت نشانگرهای RM23 و RM140 قرار دارد (Gregorio *et al.*, 2002). گزارش شده است که این QTL بیش از ۷۰ درصد از تنوع در جذب نمک را در گیاه برنج کنترل می‌کند (Bonilla *et al.*, 2002). در آزمایش دیگری روی ۵۷ ژنوتیپ برنج در مرحله گیاهچه‌ای و تحت تنش شوری (۱۰ دسی‌زیمنس بر متر) با استفاده از ۲۱ نشانگر پیوسته با QTL *Saltol* نشان داده شد که هشت نشانگر دارای چندشکلی بودند و میزان محتوای اطلاعات ژنتیکی (PIC) آنها ۰/۵۲ تا ۰/۸۲ بود (Krishnamurthy *et al.*, 2014). واکنش تحمل تنش شوری در مرحله گیاهچه‌ای روی ۳۳ ژنوتیپ برنج بومی در هند با اعمال تیمارهای شوری (۴ تا ۱۴ دسی‌زیمنس بر متر) و ارزیابی طول ریشه، طول اندام هوایی و زیست توده گیاه نشان داد که بین ژنوتیپ‌ها و

[Downloaded from agrobreedjournal.ir on 2026-11-25]

[DOR: 20.1001.1.15625540.1397.20.4.6.5]

اثرات تیمارهای شوری اختلاف معنی‌داری وجود داشت و سنجش تنوع در سطح مولکولی با استفاده از ۱۱ نشانگر پیوسته SSR مشخص نمود که سه نشانگر RM8094، RM336 و RM8046 از شاخص‌ترین نشانگرها جهت تمایز تحمل شوری در ژنوتیپ‌ها بودند (Ali *et al.*, 2014). آنها همچنین گزارش نمودند که با افزایش میزان شوری، طول ریشه، طول اندام‌های هوایی و زیست توده گیاهی بطور معنی‌داری کاهش یافتند. در آزمایشی روی ۲۹ ژنوتیپ برنج (چهار رقم بومی) و ۲۵ لاین ارسالی از موسسه بین‌المللی تحقیقات برنج (IRRI)، تحت تنش شوری (هشت دسی‌زیمنس بر متر) در مرحله گیاهچه‌ای و ارزیابی تنوع ژنتیکی در سطح مولکولی با استفاده از ۳۰ نشانگر SSR، نشان داد که مقدار PIC برای نشانگرهای مورد استفاده از ۰/۰۷ تا ۰/۷۱ (متوسط ۰/۴۵) متغیر بود و تعداد آلل برای نشانگرهای مورد استفاده نیز بین حداقل ۲ تا حداکثر ۶ عدد (متوسط ۳/۵۳) بود (Gholizadeh and Navabpour, 2014). با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره واقع روی کروموزوم شماره یک و ناحیه QTL *Saltol* با طول Mb ۵ که مسئول تحمل تنش شوری در مرحله گیاهچه‌ای بودند، مشخص شد که از میان ۲۱ نشانگر، هشت تای آنها در ۹۴ ژنوتیپ برنج مورد ارزیابی چندشکل بوده و نشانگرهای RM10839 و RM3412 به عنوان نشانگرهای شاخص در تشخیص تحمل شوری در مرحله گیاهچه‌ای شناخته شدند (Krishnamurthy *et al.*, 2015). سنجش تحمل تنش شوری در مرحله گیاهچه‌ای براساس شاخص‌های نسبی رشد نظیر طول ریشه، طول اندام هوایی، وزن ریشه و اندام هوایی میان ۱۲ ژنوتیپ برنج در تنش شوری (۱۲ دسی‌زیمنس بر متر) نشان دهنده وجود تفاوت معنی‌دار بین ژنوتیپ‌ها برای این شاخص در شرایط بدون تنش و تنش بود و برای پنج نشانگر SSR ناحیه QTL *Saltol* نیز ۲۳ آلل با میانگین PIC حدود ۰/۶۶ شناسایی شدند. نتایج یک آزمایش نشان داد که از هشت نشانگر SSR جهت ارزیابی چندشکلی QTL *Saltol* در ۱۴۲ ژنوتیپ برنج در مرحله گیاهچه‌ای در اراضی ساحلی، برای دو نشانگر RM562 و RM8094 به‌ترتیب ۵ و ۱۳ آلل، با حداکثر PIC حدود ۰/۹۹ شناخته شده و گزارش شد که RM8094 نشانگر مناسبی برای شناسایی ژنوتیپ‌های متحمل از حساس بود (Ganie *et al.*, 2016). در آزمایشی که روی میزان جوانه‌زنی بذر ۵۳ ژنوتیپ برنج در شرایط تنش شوری و اسمزی و با استفاده از ۲۶ نشانگر SSR پیوسته با صفات مرتبط با شوری و خشکی انجام شد، در مجموع ۱۱۸ آلل (هم‌ردیف ژنی) با میانگین ۴/۵۴ به ازای هر جایگاه، تولید شدند (Raiesi and Sabouri, 2016). براین اساس از میان نشانگرهای مورد استفاده، نشانگرهای RM572، RM8094، RM7075، RM3627، RM10839 و RM562 در نزدیکی جایگاه‌ها و QTLهای مرتبط با تحمل تنش شوری مکان‌یابی شدند. نشانگر ریزماهواره RM315 نیز در دو جمعیت حاصل از تلاقی برگشتی در شرایط شوری بالا (۱۸ دسی‌زیمنس بر متر) روی کروموزوم یک و نشانگر RM111 روی کروموزوم شش گزارش شدند. نقشه پیوستگی کروموزوم هشت در این آزمایش نشان داد که جایگاه نشانگر RM223 متصل با ژن تحمل شوری در فاصله ۷/۲ سانتی مورگان بود. نشانگر RM5699 نیز با استفاده از گیاهان جمعیت F_2 و خانواده‌های F_3 روی کروموزوم دو گزارش شد (Temnykh *et al.*, 2000).

با توجه به اینکه اطلاعات مرتبط با ژن‌های شناسایی شده پیوسته با تنش شوری در رابطه با ژرم‌پلاسم برنج ایرانی چندان زیاد نیست، از این‌رو اعتبارسنجی و تعیین تنوع آللی جایگاه‌های پیوسته شناسایی شده با صفات مسئول در تحمل شوری می‌تواند در انتخاب ژنوتیپ‌های مناسب جهت برنامه‌های اصلاحی برنج برای تحمل شوری حائز اهمیت باشد. در این تحقیق نشانگرهای SSR پیوسته با ژن‌ها و QTLs مسئول تحمل شوری انتخاب شدند تا اعتبارسنجی این نشانگرهای

[Downloaded from agrobreedjournal.ir on 2026-11-25]

[DOR: 20.1001.1.15625540.1397.20.4.6.5]

پیوسته در واکنش تعدادی ژرم‌پلاسم برنج ایرانی در شرایط تنش شوری در مرحله گیاهچه‌ای، تعیین تنوع آللی و دسته‌بندی ژرم‌پلاسم انجام شده و تعدادی از صفات مهم مرتبط با تحمل شوری در مرحله گیاهچه‌ای ارزیابی شوند.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی مورد استفاده در این تحقیق شامل ۵۹ رقم بومی و اصلاح شده برنج و چند رقم خارجی، از جمله ارقام شاهد استاندارد (پوکالی؛ متحمل به شوری و IR29؛ حساس به شوری) بودند که بذر آنها از موسسه تحقیقات برنج کشور و موسسه بین‌المللی تحقیقات برنج (IRRI) تهیه شدند. ویژگی‌ها و شجره ژنوتیپ‌های برنج در جدول ۱ ارائه شده است. ارزیابی ژنوتیپ‌های برنج از نظر تحمل تنش شوری در مرحله گیاهچه‌ای به صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار طی سال‌های ۹۰-۱۳۸۸ در موسسه تحقیقات برنج کشور- رشت انجام شد. تیمارهای آزمایشی شامل: ۱- بدون تنش (شاهد) (۰/۹ دسی‌زیمنس بر متر) و ۲- تنش شوری (۱۲ دسی‌زیمنس بر متر) بودند که بر اساس آزمایش مقدماتی که حدود ۵۰ درصد رقم شاهد حساس (IR29) از بین رفته بودند، انتخاب و در محیط کشت هیدروپونیک (یوشیدا) روی گیاهچه‌ها اعمال شدند. بذرها بعد از ضدعفونی با قارچ‌کش کاربوکسین تیرام، در ژرمیناتور در دمای ۲۷ درجه سانتی‌گراد جوانه‌دار شده و سپس دو عدد بذر جوانه‌دار شده به ظروف پلاستیکی با ابعاد ۲۰ ×۳۰ ×۴۰ سانتی‌متر حاوی محلول یوشیدا منتقل شدند (Yoshida *et al*., 1976). در هر یک از ظرف‌ها در سطح محلول یک ورقه یونولیتی با ۱۱ ردیف که در هر ردیف ۱۰سوراخ یک سانتیمتری تعبیه شده بود، جهت استقرار بذرهای جوانه‌دار شده و رشد گیاهچه‌ها (Gregorio *et al.*, 1997 ؛ با تغییرات جزئی) قرار داده شد (شکل ۱). گیاهچه‌ها سپس در اتاقک رشد در معرض ۱۴ ساعت روشنایی و ۱۰ ساعت تاریکی با دمای ۲±۲۵ درجه سانتی‌گراد (تاریکی) و ۲±۳۰ درجه سانتی‌گراد (روشنایی) و رطوبت نسبی ۸۰ درصد، نگهداری شدند. در طی آزمایش محلول داخل ظرف‌ها هفته‌ای یک بار تعویض و همزمان اسیدیته محلول به صورت روزانه با استفاده از هیدروکسید سدیم (NaOH) یک نرمال و یا اسید کلریدریک (HCl) یک نرمال تنظیم می‌شد. پس از گذشت ۱۰ روز از رشد گیاهچه‌ها در محلول یوشیدا و زمانی‌که گیاهچه‌ها ۴-۳ برگی شدند، تیمار شوری (هشت دسی‌زیمنس بر متر) به مدت یک هفته اعمال و پس از آن، میزان شوری به ۱۲ دسی‌زیمنس بر متر رسانده و ثابت نگه داشته شد.

ارزیابی پنج صفت مهم که در اغلب منابع جهت غربال جمعیت‌های بزرگ مورد استفاده قرار می‌گیرند (Chunthaburee *et al*., 2016; Safitri *et al*., 2017) شامل شاخص تحمل شوری، ارتفاع گیاهچه، وزن خشک ریشه، وزن خشک اندام هوایی و محتوای آب نسبی برگ (RWC) از سومین روز بعد از اعمال شوری نهایی (۱۲ دسی‌زیمنس بر متر) آغاز شد. محتوای آب نسبی برگ در روز سوم (دهمین روز از اعمال تیمار شوری)، شاخص تحمل شوری، وزن خشک ریشه و اندام هوایی و ارتفاع گیاهچه در روز هفتم بعد از اعمال شوری (۱۲ دسی‌زیمنس بر متر) (دو هفته بعد از اعمال تیمار شوری اولیه) اندازه‌گیری شدند. شاخص تحمل شوری به صورت کد۱= بسیار متحمل: رشد طبیعی و بدون علائم برگی، کد ۳= متحمل: رشد نسبتا طبیعی، برگ‌ها در نوک سفید شده و تعداد کمی از برگ‌ها سفید و لوله شده‌اند، کد ۵= تحمل متوسط: رشد کند، بسیاری از برگ‌ها لوله شده، تعدادی از برگ‌ها افراشته هستند، کد ۷= حساس: توقف رشد، بسیاری از برگ‌ها خشک و تعدادی از گیاهان مرده‌اند، کد ۹= بسیار حساس: همه گیاهان مرده و خشک شده‌اند، ارزیابی شدند (Gregorio *et al.*, 1997). ارتفاع

[Downloaded from agrobreedjournal.ir on 2026-11-25]

[DOR: 20.1001.1.15625540.1397.20.4.6.5]

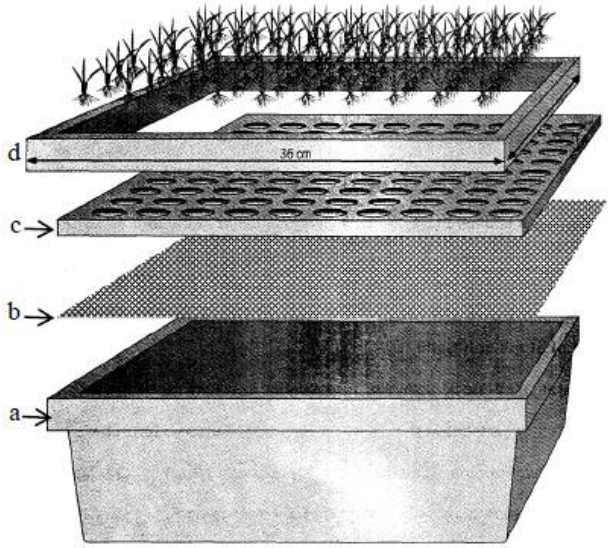
جدول ۱- مشخصات ژنوتیپ‌های برنج مورد استفاده در آزمایش

Table 1. Rice genotypes characteristics used in this experiment

ردیف No.	ژنوتیپ‌های برنج Rice genotypes		منشأ Origin		ردیف No.	ژنوتیپ‌های برنج Rice genotypes		منشأ Origin		ردیف No.	ژنوتیپ‌های برنج Rice genotypes		منشأ Origin	
1	Ghasr-o-dashti	قصرالدشتی	Local	بومی	21	Ahlami-Tarom	اهلمی طارم	Local	بومی	41	Hasansarei-Atashgah	حسن‌سرایی‌آتشگاه	Local	بومی
2	Gerdeh	گرده	Local	بومی	22	Dasht	دشت	Local	بومی	42	Hasan-sarai-P.Gh	حسن‌سرایی پیچیده غلاف	Local	بومی
3	4	۴	Local	بومی	23	Dom-Siah	دم سیاه	Local	بومی	43	Zireh	زیره	Local	بومی
4	Gharib	غریب	Local	بومی	24	Neda	ندا	Improved	اصلاح شده	44	Tarom-Amiri	طارم امیری	Local	بومی
5	Shahpasand	شاهپسند	Local	بومی	25	Tarom-Mahali	طارم محلی	Local	بومی	45	Ali-Kazemi	علی کاظمی	Local	بومی
6	Hassan-saraei	حسن سرایی	Local	بومی	26	Onda	Onda	Italy	ایتالیا	46	Gil3	گیل ۳	Improved	اصلاح شده
7	Mehr	مهر	Improved	اصلاح شده	27	Anbarbo	عنبربو	Local	بومی	47	Champa-Boudar	چمپا بودار	Local	بومی
8	IR28	IR28	IRRI	ایری	28	Sang-Tarom	سنگ طارم	Local	بومی	48	Dorfak	درفک	Improved	اصلاح شده
9	Amol1	آمل ۱	Improved	اصلاح شده	29	Sang-Jo	سنگ جو	Local	بومی	49	Gil1	گیل ۱	Improved	اصلاح شده
10	Rashti	رشتی	Local	بومی	30	Gharib-Siah-Reyhani	غریب‌سیاه‌ریحانی	Local	بومی	50	Domsefid	دم سفید	Local	بومی
11	Sadri	صدری	Local	بومی	31	Hasani	حسنی	Local	بومی	51	SHZ2	SHZ2	China	چین
12	Anbarbo-Ilam	عنبر بوی ایلام	Local	بومی	32	Jahesh	جهش	Improved	اصلاح شده	52	Line229	Line 229	Exotic	خارجی
13	Abji-boji	آبجی بوجی	Local	بومی	33	Tabesh	تابش	Improved	اصلاح شده	53	Dom-zard	دم زرد	Local	بومی
14	Mir-Tarom	میر طارم	Local	بومی	34	Fajr	فجر	Improved	اصلاح شده	54	Sahpasand-Mazandaran	شاهپسند مازندران	Local	بومی
15	Ghashangeh	قشنگه	Local	بومی	35	Sahel	ساحل	Improved	اصلاح شده	55	Tarom Deylamani	طارم دیلمانی	Local	بومی
16	Deylamani	دیلمانی	Local	بومی	36	Bejar	بجار	Improved	اصلاح شده	56	Tarom-Pakotah	طارم پاکوتاه	Local	بومی
17	Mohamadi-Chaparsar	محمدی چپر سر	Local	بومی	37	Nemat	نعمت	Improved	اصلاح شده	57	Shiroudi	شیرودی	Improved	اصلاح شده
18	Mosa-Tarom	موسی طارم	Local	بومی	38	Sepidroud	سپیدرود	Improved	اصلاح شده	58	IR29	IR29	IRRI	ایری
19	Rashti-Sard	رشتی سرد	Local	بومی	39	Khazar	خزر	Improved	اصلاح شده	59	Pokkali	Pokkali	India	هند
20	Amol3	آمل ۳	mproved	اصلاح شده	40	Tarom Mantagheh	طارم منطقه	Local	بومی					

[Downloaded from agrobreedjournal.ir on 2026-11-25]

[DOR: 20.1001.1.15625540.1397.20.4.6.5]



شکل ۱- شمای ظروف پلاستیکی مورد استفاده در آزمایش ارزیابی تحمل تنش شوری ژنوتیپ‌های برنج در مرحله گیاهچه‌ای

a: جعبه پلاستیکی، b: توری پلاستیکی، c: ورقه یونولیتی و d: نگهدارنده یونولیتی (گریگوریو و همکاران، ۱۹۹۷)

Fig. 1. Plastic box features used for screening of rice genotypes under salinity stress at vegetative stage.

a: plastic box, b: nylon net, c: styrofoam plate and d: supporter (Gregorio *et al*., 1997)

گیاهچه‌ها با استفاده از خط‌کش از محل طوقه تا انتهای بلندترین برگ توسعه‌یافته اندازه‌گیری شد. برای اندازه‌گیری محتوای آب نسبی، از جوان‌ترین برگ گیاه که کاملا گسترش یافته بود حدود دو سانتی متر نمونه برگی تهیه و پس از توزین با ترازوی حساس (۰/۰۰۰۱ گرم)، به مدت چهار ساعت در دمای اتاق در داخل آب مقطر قرار داده شدند. پس از جذب آب، وزن آماس نمونه‌ها اندازه‌گیری شده و سپس در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد در آون به مدت ۲۴ ساعت خشکانده و سپس توزین شدند. با اندازه‌گیری وزن خشک نمونه‌ها، محتوای آب نسبی با استفاده از رابطه (۱) محاسبه شد (Suriya-arunroj *et al.*, 2004).

رابطه (۱) $RWC= [(Fw - Dw) / (Sw - Dw)] \times 100$

Fw: وزن تر برگ بعد از نمونه‌برداری، Dw: وزن خشک برگ بعد از خشکاندن و Sw: وزن اشباع برگ هستند. وزن خشک اندام هوایی و ریشه گیاهچه‌ها پس از خشکاندن نمونه‌ها در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد، اندازه‌گیری شد.

برای تجزیه و تحلیل مولکولی، ابتدا استخراج DNA از نمونه‌های برگی ژنوتیپ‌های برنج در شرایط کنترل و بعد از طی دوره تاریکی (جهت استخراج با کیفیت بهتر DNA) به طور جداگانه و با روش CTAB انجام شد (Doyle and Doyle, 1990). سپس کمیت DNA روی ژل آگارز ۰/۷ درصد الکتروفورز ارزیابی شد. غربال مولکولی ژنوتیپ‌های برنج با استفاده از ۱۰ نشانگر SSR پیوسته با جایگاه‌های ژنی و اجزای تحمل شوری انجام شد (جدول ۲). برای این منظور واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) با استفاده از دستگاه ترموسایکلر و در حجم هر نمونه ۱۰ میکرولیتر انجام شد. مراحل و شرایط آزمایش شامل: ۱- واسرشته سازی اولیه به مدت سه دقیقه و دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، ۲- واسرشته سازی به مدت ۳۰ ثانیه و دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، ۳- اتصال آغازگر به مدت ۳۰ ثانیه و دمای ۵۰ تا ۶۷ درجه سانتی‌گراد، ۴- بسط توسط آنزیم *Taq pol* به

[Downloaded from agrobreedjournal.ir on 2026-11-25]

[DOR: 20.1001.1.15625540.1397.20.4.6.5]

جدول ۲- مشخصات نشانگرهای ریزماهواره مورد استفاده در آزمایش

Table 2. Microsatellite markers characteristics used in this experiment

ردیف No.	نشانگر Marker	کروموزوم Chr.	دمای اتصال Anealing temp. (°C)	اندازه نوار Band size (bp)	توالی آغازگر (مستقیم و معکوس) Primer sequences (F=Forward, R=Reverse)	منبع Reference
1	RM572	1	55	259	F CGGTTAATGTCATCTGATTGG	Ammar, 2004
					R TTCGAGATCCAAGACTGACC	
2	RM3627	1	50	116	F GGCTACTCGAGCAAGCTCTG	Poland *et al*., 2004
					R ACCTACCCGTCATCCCTCTC	
3	RM8094	1	55	209	F AGTTTGTACACATCGTATA	Singh *et al.*, 2007
					R CGCGACCAGTACTACTACTA	
4	RM10839	1	60	206	F ATGCCATGAATGTAACCGAGACG	Mohammadi-Nejad *et al*., 2008
					R AGAGAGCAATCCATGCATCTTCC	
5	RM562	1	55	248	F GATCAGTCGGTCATAAACG	Poland *et al.*, 2004
					R CACCTTCCTCTTCTGCTG	
6	RM315	1	55	124	F CGGTCAAATCATCACCTGAC	Lang *et al.*, 2001
					R AAGGCTTGCAAGGGAAG	
7	RM111	6	60	124	F CACAACCTTTGAGCACCGGGTC	Poland *et al*., 2004
					R ACGCCTGCAGCTTGATCACCGG	
8	RM223	8	67	184	F GAGTGAGCTTGGGCTGAAAC	Lang *et al.*, 2001
					R GAAGGCAAGTCTTGGCACTG	
9	RM5699	2	55	167	F ATCGTTTCGCATATGTTT	Ammar, 2004
					R ATCGGTAAAAGATGAGCC	
10	RM7075	1	60	375	F GCGTTGCAGCGGAATTTGTAGG	Reddy *et al.*, 2017
					R CCCTGCTTCTCTCGTGCAGTCG	

[Downloaded from agrobreedjournal.ir on 2026-11-25]

[DOR: 20.1001.1.15625540.1397.20.4.6.5]

مدت ۴۵ثانیه و دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد، ۵- بسط نهایی به مدت پنج دقیقه و دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد و ۶- نگهداری در دمای چهار درجه سانتی‌گراد بود که مراحل دوم تا چهارم به صورت Touch down در ۱۰ و ۲۵ چرخه انجام شدند. جهت تفکیک قطعات تکثیر شده، از الکتروفورز عمودی (Bio-Rad, USA) و ژل پلی‌آکریلامید واسرشته‌ساز ۶ درصد در طی یک تا ۱/۵ ساعت و توان ۱۰۰ وات استفاده شد. پس از پایان الکتروفورز، رنگ‌آمیزی ژل با روش نیترات نقره انجام شد.

تجزیه واریانس داده‌های حاصل از ارزیابی صفات گیاهی در شرایط کنترل و تیمار با استفاده از نرم افزار SAS v9.3 (SAS Institute. 2011. The SAS System for Windows. Release 9.3, SAS Inst., Cary, NC. USA) و روش PROC GLM انجام شد. پیش از تجزیه واریانس داده‌ها، آزمون همگنی و توزیع نرمال داده‌ها با استفاده از روش PROC Univariate انجام شد. میانگین‌های صفات با استفاده از روش PROC Means و آزمون حداقل تفاوت معنی‌داری (LSD) در سطح احتمال پنج درصد مورد مقایسه قرار گرفتند. تجزیه همبستگی پیرسون بین صفات مورد مطالعه با استفاده از روش PROC CORR انجام شد. تجزیه رگرسیون لجستیک جهت انجام آزمون پیوستگی (Cosegregation) بین هر کدام از صفات و آلل‌های هر نشانگر به طور جداگانه با استفاده از نرم افزار SPSS Ver15 انجام شد.

جهت تجزیه داده‌های مولکولی، اثرانگشت الگوی نوارهای DNA برای نشانگر ریزماهواره به صورت مشاهده‌ای و بر اساس وجود (۱) و عدم وجود (صفر) امتیاز داده شدند. سپس با استفاده از نسخه GenAlEx 6.5 آماره‌های هتروزیگوسیتی در هر جایگاه (محتوی اطلاعات چند شکلی؛ PIC) و فراوانی آللی مشاهده شده در هر جایگاه با استفاده از رابطه (۲) محاسبه شد (Peakall and Smouse, 2012).

رابطه (۲) $PIC= 1- \Sigma p_i^2$

p: فراوانی آلل i ام می‌باشد.

تجزیه خوشه‌ای داده‌های مولکولی با استفاده از نرم‌افزار NTSYSpc ver2.02e و الگوریتم UPGMA و ضریب تشابه Yule، طبق روش چوی و همکاران (Choi *et al.*, 2010)، انجام شد.

نتایج و بحث

نتایج حاصل از تجزیه واریانس نشان داد که اثر تیمار تنش شوری روی صفات وزن خشک اندام هوایی و وزن خشک ریشه معنی‌دار نبود، اما اثر آن بر ارتفاع گیاهچه (با میانگین ۱۰/۳ درصد کاهش) و محتوای آب نسبی (با میانگین ۵/۳ درصد کاهش)، در سطح احتمال پنج درصد معنی‌دار بود. اثر ژنوتیپ‌های برنج، به‌جز برای وزن خشک ریشه، برای سایر صفات معنی‌دار بود. نتایج نشان داد که از میان ژنوتیپ‌های برنج، اغلب ارقام (بیش از ۴۲ رقم)، از جمله ۱۰ رقم شامل: IR28 ، موسی طارم، جهش، خزر، چمپا بودار، حسن سرایی، اوندا، مهر و عنبربوی ایلام دارای شاخص تحمل شوری ۷ یا بالاتر بودند و از این‌رو جزء ارقام حساس و خیلی حساس شناخته شدند. رقم IR29 نیز که ژنوتیپ شاهد حساس به شوری بود در این گروه قرار گرفت. سه رقم پوکالی، شیرودی، شاه پسند مازندران دارای شاخص تحمل شوری ۳ و ۴ بودند و از این‌رو جزء ارقام با واکنش متحمل دسته‌بندی شدند. سایر ارقام از قبیل ندا، طارم منطقه، آبجی بوجی، سنگ جو، رشتی، حسنی، دم سفید در گروه تحمل متوسط ارزیابی شدند.

نتایج نشان داد که اغلب ارقام ایرانی مورد ارزیابی واکنشی شبیه رقم شاهد حساس IR29 داشتند. دسته‌بندی ارقام در گروه‌های بسیار حساس، حساس، متحمل متوسط و متحمل نشان‌دهنده تنوع ژنتیکی ارقام مورد ارزیابی در مرحله گیاهچه‌ای در شرایط تنش شوری بود. در یک آزمایش میزان

[Downloaded from agrobreedjournal.ir on 2026-11-25]

[DOR: 20.1001.1.15625540.1397.20.4.6.5]

جدول ۳- مقایسه میانگین صفات گیاهچه‌ای ۱۰ رقم با تحمل بالا و ۱۰ رقم برنج حساس در تیمارهای بدون تنش و تنش شوری

Table 3. Mean comparison of seedling traits under normal and salinity stress treatments for 10 most tolerant and 10 susceptible rice genotypes

متحمل‌ترین ژنوتیپ Most tolerant genotype				حساس‌ترین ژنوتیپ Most susceptible genotype		
ژنوتیپ‌های برنج Rice genotypes		محتوای آب نسبی RWC (%)	ارتفاع گیاهچه Seedling height (cm)	ژنوتیپ‌های برنج Rice genotypes	محتوای آب نسبی RWC (%)	ارتفاع گیاهچه Seedling height (cm)
Domsefid	دم سفید	¥4.56^{ns}	-0.38^{ns}	Onda	-6.87^{ns}	0.90^{ns}
Hasani	حسنی	-1.01^{ns}	2.72*	Mosa-tarom	18.17*	3.48*
Rashti	رشتی	1.94^{ns}	1.35^{ns}	Jahesh	8.12^{ns}	0.99^{ns}
Sang-Jo	سنگ جو	-0.63^{ns}	2.42*	Khazar	19.94*	0.69^{ns}
Abji-boji	آبجی بوجی	-7.33^{ns}	0.33^{ns}	Champa-Bodar	4.59^{ns}	0.61^{ns}
Tarom-Mantaghe	طارم منطقه	0.49^{ns}	1.91^{ns}	Hasan-sarai	-0.57^{ns}	0.46^{ns}
Neda	ندا	5.85^{ns}	-0.58^{ns}	Mehr	9.38^{ns}	0.02^{ns}
Shahpasand-Mazandaran	شاهپسند مازندران	-4.79^{ns}	3.22*	IR28	6.69^{ns}	0.39^{ns}
Shiroudi	شیرودی	-4.02^{ns}	0.18^{ns}	Anbarbo-Ilam	-5.29^{ns}	1.42^{ns}
Pokkali	پوکالی	5.36^{ns}	1.05^{ns}	Line229	7.18^{ns}	0.01
Mean	میانگین§	70.67	7.82		65.91	7.04

ns ، * و **: به‌ترتیب نشان دهنده تفاوت غیرمعنی‌دار و معنی‌دار در سطوح احتمال پنج و یک درصد، با استفاده از آزمون حداقل تفاوت معنی‌دار (LSD) می‌باشند. ¥: نشان دهنده تفاوت میانگین صفت (تیمار بدون تنش با تنش شوری) و §: میانگین کل صفت در هر گروه از ژنوتیپ‌ها می‌باشند

ns, *and **: Non significant and significant differences at 5% and 1% probability levels, using Least Significant Differences (LSD) test. ¥: Difference of mean of the trait (normal and stress condition), §: Grand mean of trait in each set of genotypes

جدول ۴- ضرایب همبستگی پیرسون بین صفات گیاهچه‌ای ژنوتیپ‌های برنج در تیمارهای بدون تنش و تنش شوری

Table 4. Pearson correlation coefficients between seedling traits of rice genotypes under normal and salinity stress treatments

Seedling traits	صفات گیاهچه‌ای		وزن خشک اندام هوایی Shoot dry weight	وزن خشک ریشه Root dry weight	ارتفاع گیاهچه Seedling height	محتوی آب نسبی Relative water content	نمره تحمل شوری Salinity tolerance score
Shoot dry weight	وزن خشک اندام هوایی	S†	1.000	**0.499	**0.732	**0.512	**-0.421
		C	1.000	0.165 ^{ns}	**0.705	**0.422	-
Root dry weight	وزن خشک اندام ریشه	S			**0.577	**0.408	**-0.358
		C			0.197 ^{ns}	0.045 ^{ns}	-
Seedling height	ارتفاع گیاهچه	S				**0.660	**-0.477
		C				**0.423	-
Relative water content	محتوی آب نسبی	S					**-0.535
		C					-
Salinity tolerance score	نمره تحمل به شوری	S					1.000
		C					-

ns ، * و **: به‌ترتیب نشان دهنده تفاوت غیرمعنی‌دار و معنی‌دار در سطوح احتمال پنج و یک درصد می‌باشند

-: فاقد داده در تیمار بدون تنش، †: تیمارهای آزمایشی؛ S: تنش شوری و C: بدون تنش

ns, *and **: Non significant and significant differences at 5% and 1% probability levels

- no data in control treatment, †: treatments; S: Salinity stress and C: Control

[Downloaded from agrobreedjournal.ir on 2026-11-25]

[DOR: 20.1001.1.15625540.1397.20.4.6.5]

شاخص تحمل شوری برای ارقام شاخص مانند پوکالی و IR29 به‌ترتیب ۳/۰ و ۵/۴ گزارش شد (Chunthaburee *et al.*, 2016). در آزمایش حاضر همچنین مشخص شد که رقم موسی‌طارم با دارا بودن بالاترین نمره شاخص تحمل شوری و بیشترین کاهش در صفات، به عنوان حساس‌ترین ژنوتیپ و رقم شیرودی با کمترین کاهش در ارتفاع گیاهچه، افزایش محتوای آب نسبی و نمره شاخص تحمل پایین، رقمی با واکنش مناسب از نظر تحمل شوری شناخته شدند. در آزمایشی که روی تعداد متنوعی از ارقام برنج از جمله ارقام ایرانی و خارجی در سه تیمار بدون تنش (۱/۲ دسی‌زیمنس بر متر)، لب شور (۴ دسی‌زیمنس بر متر) و شور (۸ دسی‌زیمنس بر متر) در مرحله گیاهچه‌ای اجرا شد گزارش گردید که ارقام سپیدرود، خزر، IR28 و IR29 بسیار حساس به شوری بودند (Sabouri *et al.*, 2008). در همین گزارش ارقام طارم محلی، غریب، شاه‌پسند مازندران و اهلمی طارم به دلیل دارا بودن زیست توده، طول ریشه و اندام هوایی بیشتر، در گروه ارقام متحمل قرار گرفتند. با توجه به اینکه در آزمایش حاضر از شدت شوری بالاتری استفاده شده است، تحمل متوسط این ارقام را می‌توان با این عامل مرتبط دانست. در آزمایش دیگری که روی تعدادی از صفات از جمله نمره تحمل شوری در ارقام برنج انجام شد، برای ارقام قصرالدشتی، موسی طارم، خزر، سپیدرود، آمل۳، نعمت و IR28 واکنش حساسیت گزارش شد (Mirdar-Mansuri *et al.*, 2012).

مقایسه میانگین‌ها برای صفاتی که در تجزیه واریانس معنی‌دار شده بودند، در ۱۰ رقم با تحمل بالا و ۱۰ رقم برنج بسیار حساس در تیمار بدون تنش و تنش شوری نشان داد که ارقام سنگ‌جو، شاه‌پسند مازندران و حسنی، به ترتیب با ۲/۱۱-، ۱/۵۰- و ۲/۷۳- سانتی‌متر، کاهش معنی‌داری در ارتفاع گیاهچه نسبت به تیمار شاهد داشتند (جدول ۳). نتایج نشان داد که کمترین کاهش در ارتفاع گیاهچه مربوط به رقم شیرودی (۰/۱۸ سانتی‌متر) بود. برای صفت محتوای آب نسبی برگ، تفاوت معنی‌داری بین تیمار بدون تنش و تنش شوری مشاهده نشد. در میان ارقام حساس، تفاوت معنی‌داری برای ارتفاع گیاهچه در رقم موسی طارم (۵/۴۸- سانتی‌متر) در تیمارهای بدون تنش و تنش شوری مشاهده شد. در بین ژنوتیپ‌های حساس، دو رقم موسی طارم و خزر تفاوت معنی‌داری برای محتوی آب نسبی برگ داشتند. سوریا-اروج و همکاران (Suriya-aruroj *et al.*, 2004) با آزمایش روی ۱۶ ژنوتیپ برنج تحت تنش شوری در مرحله گیاهچه‌ای گزارش دادند که طول اندام هوایی بیشتر، وزن خشک زیاد ریشه و اندام هوایی با تحمل به تنش شوری مرتبط بودند. آنها اعلام کردند که در شرایط تنش گیاهان با محتوای آب نسبی بالاتر متحمل به شوری بودند. سینکلر و لادلو (Sinclair and Ludlow, 1985) نیز پیشنهاد کردند که محتوای آب نسبی در مقایسه با پتانسیل آبی، شاخص بهتری برای بیان وضعیت آب در اندام‌های گیاهی است، ضمن آنکه روش ارزان، سریع و مناسب‌تری، در مقایسه با سایر روش‌های پرهزینه مرتبط به تحمل به شوری، محسوب می‌شود. لی و همکاران (Lee *et al.*, 2003) نیز در آزمایشی روی ارقام مختلف برنج ژاپونیکا و ایندیکا در شرایط تنش شوری (۱۲ دسی‌زیمنس بر متر) اختلاف معنی‌داری در صفات ارتفاع گیاهچه، وزن خشک ریشه و اندام هوایی بین تیمارهای بدون تنش و تنش شوری گزارش نمودند.

به منظور درک روابط بین صفات مورد ارزیابی در دو تیمار اعمال شده، تجزیه همبستگی بین صفات در شرایط تنش و بدون تنش انجام شد. نتایج نشان داد که پس از اعمال تنش شوری همبستگی معنی‌داری بین کلیه صفات مورد مطالعه وجود داشت، در حالی‌که این معنی‌داری در تیمار بدون تنش بین همه صفات برقرار نبود (جدول ۴). در هر دو تیمار بدون تنش و تنش شوری، ارتفاع گیاهچه و وزن خشک اندام هوایی

[Downloaded from agrobreedjournal.ir on 2026-11-25]

[DOR: 20.1001.1.15625540.1397.20.4.6.5]

بالاترین همبستگی مثبت و معنی‌دار (به‌ترتیب r=۰/۷۰۵ و r=۰/۷۳۲) را در سطح احتمال یک درصد داشتند. در عین حال محتوای آب نسبی گیاه همبستگی مثبت و معنی‌داری با ارتفاع گیاهچه‌ها (r=۰/۶۶۰) و وزن خشک ریشه (r=۰/۴۰۸) (در سطح احتمال ۵ درصد) نشان داد. بین شاخص تحمل شوری و صفات مورد ارزیابی همبستگی منفی و معنی‌داری مشاهده شد که این میزان با محتوای آب نسبی گیاه بالاترین مقدار ($p < ۰/۰۱$; r=-۰/۵۳۵) بود. وجود همبستگی منفی معنی‌دار بین شاخص تحمل شوری و وزن خشک ریشه و اندام هوایی در آزمایشی روی ۱۲ ژنوتیپ برنج در تنش شوری (۱۰ دسی‌زیمنس بر متر) (Chunthaburee *et al.*, 2016) و همچنین در آزمایشی روی شش ژنوتیپ برنج در تنش شوری (۱۲ دسی‌زیمنس بر متر) (Rajesh *et al.*, 2015) در مرحله گیاهچه‌ای نیز گزارش شده است. در آزمایش دیگری نشان داده شد که ژنوتیپ‌هایی از برنج که محتوای آب نسبی بالا داشتند، میزان خسارت تنش شوری کمتری را نشان دادند (Suriya-arunroj *et al.*, 2004). بعلاوه گزارش شده است که ژنوتیپ‌های برنج که در معرض تنش شوری قرار داشتند، طول ساقه‌چه، زیست توده گیاه و محتوای آب نسبی در گروه حساس به طور معنی‌داری کاهش یافتند (Ali *et al.*, 2014b). این کاهش می‌تواند به‌علت اثرات سمیت نمک و کاهش قابلیت دسترسی به عناصر غذایی، به ویژه در مرحله گیاهچه‌ای باشد (Safitria *et al.*, 2017). افزایش محتوای آب نسبی در ژنوتیپ‌های متحمل برنج می‌تواند باعث افزایش میزان محافظت کننده‌های اسمزی شود که این موضوع وارد شدن خسارت به سلول را در اثر از دست دادن آب، کاهش خواهد داد (Yancey *et al.*, 1982).

غربال ژنتیکی ژنوتیپ‌های برنج با استفاده از ۱۰ نشانگر SSR پیوسته با ژن‌ها و QTLهای مسئول تحمل شوری که روی کروموزوم‌هایی با ژن‌های مسئول تحمل شوری قرار دارند، انجام شد. نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل مولکولی نشان داد که کلیه نشانگرهای مورد استفاده در این آزمایش در بین ژنوتیپ‌های برنج مورد ارزیابی چندشکلی داشتند و از ۱۰ جفت نشانگر مورد استفاده، در مجموع ۶۰ آلل (نوار) در بین ۵۹ رقم (با میانگین ۶ آلل) تکثیر شدند. تعداد آلل‌های تکثیر شده بین حداقل دو برای نشانگر RM10839 تا حداکثر ۱۲ برای نشانگر RM3627 متغیر بود. کوچک‌ترین قطعه به دست آمده (۱۱۶ جفت باز) در نشانگر RM315 و بزرگ‌ترین آن (۴۰۰ جفت باز) مربوط به نشانگر RM7075 بود.

محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC) محاسبه شده در این آزمایش و در جمعیت ارقام اصلاح شده ۰/۶۰۸ و برای جمعیت ارقام بومی ۰/۵۷۶ بود. بیشترین میزان هتروزیگوسیتی مربوط به نشانگر RM3627 (۰/۸۶۴) و کمترین آن مربوط به نشانگر RM111 (۰/۰۵۳) مشاهده شد که هر دو در جمعیت ارقام بومی مشاهده شدند (جدول ۵). این موضوع نشان می‌دهد که میزان تنوع آللی برای نشانگر RM3627 در میان ژنوتیپ‌های مورد مطالعه بالاتر بود، در نتیجه آلل‌های کنترل کننده جهت تحمل شوری متنوع بوده و تعداد متعددی از آنها در مسیر کنترلی می‌توانند نقش ایفا کنند.

در عین حال برای نشانگر RM562 چهار آلل و PIC حدود ۰/۴۰۱ گزارش شده است (Gholizadeh and Navabpour, 2015) که با نتایج حاصل از آزمایش حاضر تا حد زیادی نزدیک می‌باشد. البته تفاوت در آلل‌ها و میزان PIC وابسته به جمعیت است که بسته به زمینه ژنتیکی ارقام، می‌تواند متفاوت باشد. گزارش شده است که نشانگرهایی با میزان PIC بیشتر از ۰/۵ دارای اطلاعات مفید و تنوع قابل قبولی هستند و می‌توان از آنها در برنامه‌های اصلاحی بطور اثربخشی استفاده کرد (Krishnamurthy *et al.*, 2015).

جهت دسته بندی ژنوتیپ‌های برنج براساس الگوی نوار تولید شده حاصل از تکثیر ۱۰ نشانگر ریزماهواره

[Downloaded from agrobreedjournal.ir on 2026-11-25]

[DOR: 20.1001.1.15625540.1397.20.4.6.5]

جدول ۵- محتوای اطلاعات چندشکلی در نشانگرهای ریزماهواره مورد استفاده در آزمایش

Table 5. Polymorphic information content of SSR markers used in this experiment

نشانگر Marker	جمعیت ژنوتیپ‌های اصلاح شده برنج Improved rice genotypes population		جمعیت ژنوتیپ‌های بومی برنج Local rice genotypes population	
	محتوی اطلاعات چندشکلی Polymorphic Information Content	تعداد نمونه No. genotypes	محتوی اطلاعات چندشکلی Polymorphic Information Content	تعداد نمونه No. genotypes
RM315	0.649	22	0.661	37
RM111	0.224	22	0.053	37
RM223	0.702	22	0.768	37
RM562	0.724	22	0.688	37
RM3627	0.847	22	0.864	37
RM7075	0.690	22	0.369	37
RM10839	0.165	22	0.470	37
RM8094	0.764	22	0.785	37
RM572	0.463	22	0.408	37
RM5699	0.835	22	0.693	37
میانگین Mean	0.608	-	0.576	-

پیوسته با اجزای مختلف مسئول تحمل تنش شوری، تجزیه خوشه‌ای انجام شد. نتایج نشان داد که ۵۹ ژنوتیپ مورد ارزیابی در چهار گروه اصلی و پنج گروه فرعی (در گروه‌های اصلی) دسته‌بندی شدند (شکل ۲). در گروه اول ارقام قصرالدشتی، گرده، حسن سرایی آتشگاه، حسن سرایی پیچیده غلاف، شماره ۴، غریب، دم سفید، حسن سرایی، رشتی، صدری، موسی طارم، طارم منطقه، علی کاظمی، چمپا بودار، گیل۱، میر طارم، شاه‌پسند، آبجی بوجی، طارم دیلمانی، رشتی سرد، سنگ جو، شاه‌پسند مازندران، دیلمانی، طارم پاکوتاه، اهلمی طارم، سنگ طارم، طارم محلی، حسنی، دم سیاه، عنبر بوی ایلام، غریب سیاه ریحانی، قشنگه، طارم امیری، دم زرد، آمل ۱، اوندا، IR28، عنبر بو قرار گرفتند. به جز گیل۱، آمل۱، اوندا، IR28 که ارقام اصلاح شده هستند، سایر اعضای تشکیل دهنده این گروه ارقام بومی بودند. این ژنوتیپ‌ها در گروه با حساسیت بالا تا متوسط با نمره تحمل شوری بالاتر از ۵ قرار گرفتند. محمدی چپرسر به طور جداگانه در گروه دوم قرار گرفت. گروه سوم از ژنوتیپ‌های مهر، زیره، گیل ۳، درفک تشکیل شد. آمل ۳، دشت، ندا، سپیدرود، نعمت، جهش، تابش، فجر، ساحل، بجار، SHZ2، Line229، IR29، شیرودی، پوکالی، اعضای گروه چهارم بودند. این گروه هم مجموعه‌ای متنوع از ارقام حساس و متحمل نظیر پوکالی را در بر داشت. علت تنوع می‌تواند به تنوع در سازوکارهای تحمل شوری در هر یک از ژنوتیپ‌ها مرتبط باشد که در سطح مولکولی نیز چنین وضعیتی را ایجاد نمود و ممکن است صفات دیگری را نیز شامل شوند که در این آزمایش بررسی نشدند. موسی طارم به تنهایی در گروه پنجم قرار گرفت.

تجزیه و تحلیل رگرسیون لجستیک بین صفات و داده‌های مولکولی نشان داد که در مجموع از میان ۱۰ نشانگر مورد استفاده، چهار جایگاه RM315، RM223، RM3627 و RM8094 جمعاً با ۱۰ آلل در شرایط تنش شوری رابطه معنی‌داری با حداقل یک صفت داشتند که از میان آنها نشانگر RM8094 با چهار آلل، یک آلل با وزن خشک اندام هوایی (R^2=۰/۲۷۶)، یک آلل با ارتفاع گیاهچه (R^2=۰/۳۲۰) و دو آلل با محتوای آب نسبی گیاه (R^2=۰/۴۶۵ و R^2=۰/۳۸۶)، بیشترین سهم را داشتند (جدول ۶) که در عین حال تعدادی از این آلل‌ها توجیه کننده تغییرات در ژنوتیپ‌های مورد ارزیابی بودند. در آزمایش انجام شده توسط لانگ و

[Downloaded from agrobreedjournal.ir on 2026-11-25]

[DOR: 20.1001.1.15625540.1397.20.4.6.5]

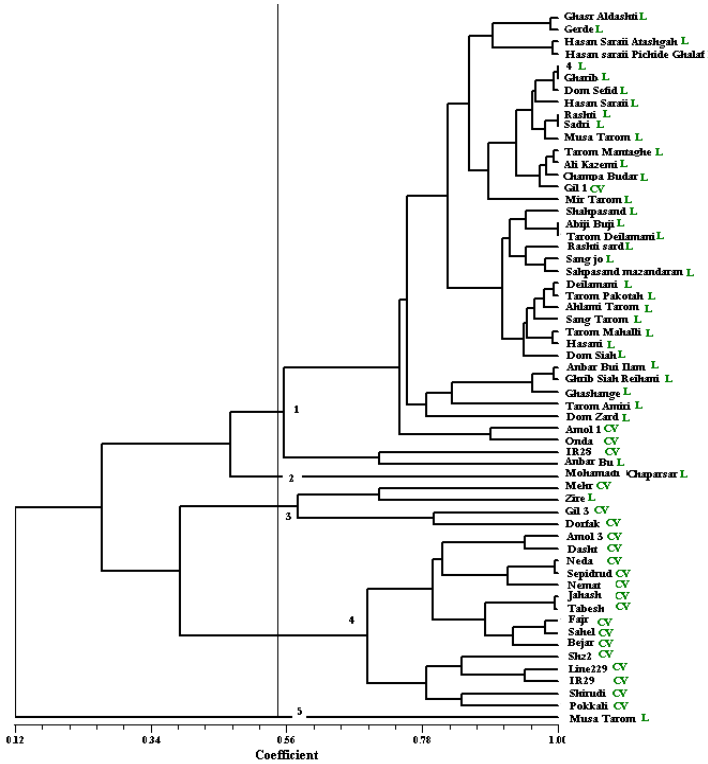
جدول ۶- وضعیت نشانگرها و تعدادآلل‌های دارای پیوستگی با تغییرات صفات در ژنوتیپ‌های برنج در شرایط تنش شوری

Table 6. Performance of markers and number of alleles co-segregated with traits in rice genotypes under salinity stress

نشانگر Marker	تعداد آلل تکثیر شده No. of amplified allele	محتوای آب نسبی Relative water content (RWC)	ارتفاع گیاهچه Seedling height	وزن خشک ریشه Root dry weight	وزن خشک اندام هوایی Shoot dry weight
RM315	3	-	1	-	-
RM111	3	-	2	-	-
RM223	5	-	2	-	1
RM562	7	-	1	-	1
RM3627	12	1†	3	-	1
RM7075	6	-	1	-	-
RM10839	2	2	2	-	-
RM8094	10	2	-	1	-
RM572	3	-	-	-	1
RM5699	9	-	1	1	-

†: آلل‌های پیوسته با هر صفت در سطح احتمال یک درصدانتخاب شدند

†: Cosegregated alleles with each trait was selected at $p < 0.001$



شکل ۲- دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای ژنوتیپ‌های برنج با استفاده از داده‌های مولکولی حاصل از ۱۰ نشانگر ریزماهواره، L: ژنوتیپ‌های بومی و CV: ارقام اصلاح شده ایرانی و خارجی

Fig. 2. Dendrogram generated through cluster analysis on molecular data from SSR linked markers to salinity tolerance in rice genotypes; L: Local, CV: Iranian improved cultivars

[Downloaded from agrobreedjournal.ir on 2026-11-25]

[DOR: 20.1001.1.15625540.1397.20.4.6.5]

همکاران (Lang *et* al., 2001) گزارش شد که نشانگر RM223 با ژن تحمل شوری روی کروموزوم ۸ پیوسته بود. در آزمایش دیگری برای دو نشانگر RM562 و RM8094 به ترتیب ۵ و ۱۳ آلل با حداکثر PIC حدود ۰/۹۹ گزارش شد و همچنین مشخص شد که RM8094 نشانگر مناسبی برای تفکیک و تمایز ژنوتیپ‌های متحمل از حساس بود (Ganie *et al.*, 2016).

نتیجه‌گیری

نتایج این تحقیق نشان داد که غربالگری مولکولی با استفاده از ۱۰ نشانگر ریزماهواره در ژنوتیپ‌های برنج مورد ارزیابی در مجموع ۶۰ آلل در ژنوتیپ‌های برنج ایجاد نمود. همچنین از ۱۰ نشانگر (مکان ژنی) ریزماهواره پیوسته، چهار نشانگر توجیه‌کننده تغییرات در واکنش به شوری؛ به‌ترتیب RM315 برای ارتفاع گیاهچه، RM223 برای وزن خشک ریشه (R^2=۰/۱۶۰) و ارتفاع گیاهچه (R^2=۰/۴۳۱)، RM3627 وزن خشک ریشه و ارتفاع گیاهچه و محتوای آب نسبی و RM8094 برای وزن خشک ریشه (R^2=۰/۵۲۵) و محتوای آب نسبی (R^2=۰/۴۶۵) بودند. تجزیه خوشه‌ای براساس داده‌های مولکولی با استفاده از ضریب Yule و روش گروه‌بندی UPGMA، ژنوتیپ‌های برنج را به پنج دسته تقسیم کرد. با توجه به ارتباط چهار جایگاه شناسایی شده توسط نشانگرهای RM8094، RM3627 و RM315 که روی کروموزوم یک واقع شده و با ژن *Saltol* پیوسته هستند و تغییرات در صفات مورد ارزیابی را به خوبی توجیه کردند، ژنوتیپ‌های متحمل نظیر پوکالی، شاه‌پسند و حسنی بخوبی شناسایی شدند، بنابراین می‌توان از آنها در شناسایی ژنوتیپ‌های متحمل و حساس برنج استفاده کرده و ژنوتیپ‌های واجد این جایگاه‌ها را در برنامه‌های اصلاح برای تحمل به شوری مورد استفاده قرار داد.

سپاسگزاری

این مقاله حاصل از یک پروژه تحقیقاتی خاص است که در قالب بخشی از برنامه چالش جهانی آب و غذا، به شماره ۷ (CPWF, PN:7) در موسسه تحقیقات برنج کشور- رشت و با همکاری موسسه بین‌المللی تحقیقات برنج (IRRI) اجرا شد.

منابع مورد استفاده

References

Ali, M. N., L. Yeasmin, S. Gantait, R. Goswami and S. Chakraborty. 2014. Screening of rice landraces for salinity tolerance at seedling stage through morphological and molecular markers. Physiol. Mol. Biol. Plants. 20(4): 411–423.

Ammar, M.H.M. 2004. Molecular mapping of salt tolerance in rice. PhD Thesis, Indian Agriculture Research Institute, New Delhi, India.

Bonilla, P., J. Dvorak, D. Mackill, K. Deal and G. Gregorio. 2002. RFLP and SSLP mapping of salinity tolerance genes in chromosome 1 of rice (*Oryza sativa* L.) using recombinant inbred lines. Philippines Agric. Sci. 85: 68–76.

Choi, S. S., S. H. Cha and C. C. Tappert. 2010. A survey of binary similarity and distance measures. Syst. Cybernet. Informat. 8(1): 3-48.

Chunthaburee, S., A. Dongsansuk, J. Sanitchon, W. Pattanagul and P. Theerakulpisut. 2016. Physiological and biochemical parameters for evaluation and clustering of rice cultivars differing in salt tolerance at

[Downloaded from agrobreedjournal.ir on 2026-11-25]

[DOR: 20.1001.1.15625540.1397.20.4.6.5]

seedling stage. Saudi J. Biol. Sci. 23: 467–477.

Doyle, J. J. and J. L. Doyle. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus. 12: 13-15.

Fathi, M. and M. Rezaei. 2013. Soil Salinity in the Central Arid Region of Iran: Isfahan Province. P. 141-153. In Shahid S. *et.al* (Eds.) Developments in Soil Salinity Assessment and Reclamation. Springer, Dordrecht.

Ganie, S. A., M. J. Borgohain, K. Kritika, A. Talukdar, D. R. Pani and T. K. Mondal. 2016. Assessment of genetic diversity of *Saltol* QTL among the rice (*Oryza sativa* L.) genotypes. Physiol. Mol. Biol. Plants, 22(1):107–114.

Gholizadeh, F. and S. Navabpour. 2014. Estimation of genetic diversity in rice (*Oryza sativa* L.) genotypes using SSR markers under salinity stress. Iran. J. Plant Physiol. 4(3): 1039-1046.

Gregorio, G. B., D. Senadhira, R. D. Mendoza, N. L. Manigbas, J. P. Roxas and C. Q. Guerta.2002. Progress in breeding for salinity tolerance and associated abiotic stresses in rice. Field Crops Res. 76: 91–101.

Gregorio, G. B., Senadhira, D. and R. D. Mendoza. 1997. Screening rice for salinity tolerance. IRRI Discussion Paper Series no. 22, International Rice Research Institute, Manila, Philippines.

Krishnamurthy, S. L., S. K. Sharma, V. Kumar, S. Tiwari and N. K. Singh. 2015. Analysis of genomic region spanning *Saltol* using SSR markers in rice genotypes showing differential seedlings stage salt tolerance. J. Plant Biochem. Biotechnol. 25(3): 331-336

Krishnamurthy, S. L., S. K. Sharma, V. Kumar, S. Tiwari1, V. Batra and N. K. Singh. 2014. Assessment of genetic diversity in rice genotypes for salinity tolerance using *Saltol* markers of chromosome 1. Indian J. Genet. 74(2): 243-247.

Lang, N. T., Z. Li and B. C. Buu. 2001. Microsatellite markers linked to salt tolerance in rice. Omonrice. 9: 9-21.

Lee, K. S., W. Y. Choi and J. C. Ko. 2003. Salinity tolerance of *japonica* and *indica* rice (*Oryza sativa* L.) at the seedling stage. Planta. 216: 1043-1046.

Mirdar-Mansuri, S., N. A. Babaeian-Jelodar and N. Bagheri. 2012. Evaluation of rice genotypes to salt stress in different growth stages via phenotypic and random amplified polymorphic DNA (RAPD) marker assisted selection. Afr. J. Biotechnol. 11(39):9362-9372.

Mohammadi-Nejad, G., A. Arzani, A. M. Rezai, R. K. Singh and G. B. Gregorio. 2008. Assessment of rice genotypes for salt tolerance using microsatellite markers associated with the *saltol* QTL. Afr. J. Biotechnol. 7(6): 730-736.

Moumeni, A. and H. Shokri-Vahed. 2013. Genetic analysis of salt tolerance in Iranian selected rice genotypes. Iran. J. Crop Sci. 15(2): 90-106. (In Persian with English abstract).

Moumeni, A., M. Mohammadian and M. Z. Nouri. 2009. Field screening of rice genotypes for salinity tolerance in Mazandaran. Electronic J. Crop Prod. 2: 129-144 (In Persian with English abstract).

Peakall, R. and P. E. Smouse. 2012. GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research—an update. Bioinformatics. 28(19): 2537–2539.

[Downloaded from agrobreedjournal.ir on 2026-11-25]

[DOR: 20.1001.1.15625540.1397.20.4.6.5]

Poland, D., M. Sawkins, J. M. Ribaut and D. Hoisington. 2004. Resilient crops for water limited environments. Proceedings of a Workshop Held at Cuernavaca, Mexico, 24-28 May 2004. Mexico. D.F. CIMMYT.

Raiesi, T. and A. Sabouri. 2016. Investigation and comparison of aerobic and Iranian rice based on markers linked to traits related to drought and salinity tolerance and their relationship with germination traits under osmotic stress. Iranian J. Field Crops Sci. 47(3): 503-514. (In Persian with English abstract).

Rajesh, B., D. O. Marjorie, E. James, M. Abdelbagi and M. Satyen. 2015. Phenotyping rice (*Oryza sativa* L.) genotypes for physiological traits associated with tolerance of salinity at seedling stage. Sci. Agric. 12(3): 156-162.

Reddy, I. N. B. L., S. M. Kim, B. K. Kim, I. S. Yoon and T. R. Kwon. 2017. Identification of rice accessions associated with K^+/Na^+ ratio and salt tolerance based on physiological and molecular responses. Rice Sci. 24(6): 360-364.

Sabouri, H., A. Rezai and A. Moumeni. 2008. Evaluation of salt tolerance in Iranian landrace and improved rice cultivars. J. Water Soil Sci. 12(45): 47-63. (In Persian with English abstract).

Safitria, H., B. S. Purwokob, I. S. Dewic and S. W. Ardieb. 2017. Salinity tolerance of several rice genotypes at seedling stage. Indon. J. Agric. Sci. 18(2): 63–68.

Sinclair, T. P. and M. M. Ludlow. 1985. Who taught plants thermodynamics? The unfulfilled potential of plant water potential. Aust. J. Plant Physiol. 33: 213-7.

Singh, R. K., G. B. Gregorio and R. K. Jain. 2007. QTL mapping for salinity tolerance in rice. Physiol. Mol. Biol. Plants. 13(2): 87-99.

Suriya-aruroj, D., N. Supapoj, T. Toojinda and A. Vanavichit. 2004. Relative leaf water content as an efficient method for evaluating rice cultivars for tolerance to salt stress. Sci. Asia. 30: 411- 415.

Temnykh, S., V. D. Park, N. Ayres, S. Cartinhour, N. Hauck, L. Lipovichi, Y. G. Cho, T. Ishii and S. R. McCouch. 2000. Mapping and genome organization of microsatellite sequences in rice (*Oryza sativa* L.). Theor. Appl. Genet. 100: 697-712.

Yancey, P. H., M. E. Clark, S. C. Hand, R. D. Bowlus and G. N. Somero. 1982. Living with water stress: Evolution of osmolyte systems. Science. 217: 1214-1222.

Yoshida, S., D. A. Forno, J. H. Cock and K. A. Gomez. 1976. Laboratory manual for physiological studies of rice (3rd Ed.), International Rice Research Institute, Los Bãnos, Laguna, Philippines.

[Downloaded from agrobreedjournal.ir on 2026-11-25]

[DOR: 20.1001.1.15625540.1397.20.4.6.5]

Assessment of diversity and validation of microsatellite markesr associated with salinity tolerance in rice (*Oryza sativa* L.) genotypes

Rouhani, S. A.[1], A. Moumeni[2], A. A. Ebadi[3] and B.Ghareyazie[4]

ABSTRACT

Rouhani, S. A., A. Moumeni, A. A. Ebadi and B. Ghareyazie. 2019. Assessment of diversity and validation of microsatellite markesr associated with salinity tolerance in rice (*Oryza sativa* L.) genotypes**. Iranian Journal of Crop Sciences. 20(4): 344-360. (In Persian).**

Ten SSR morkers linked to different genes and QTLs responsible for the salinity tolerance in rice, including *Saltol* QTL which located between zero to 8 CM of the genes, were used to validate their co-segregation with salinity tolerance. Fifty nine diverse rice genotypes including local and improved cultivars mostly from Iran and few exotic rice genotypes were tested during 2009-2011 at Rice Research Institute of Iran, and data were collected on several important traits such as salinity tolerance, seedling height, root dry matter, shoot dry matter and leaf relative water content (RWC). The treatments were: a. control with an electrical conductivity of 0.9 $dS.m^{-1}$ and b. salinity stress with EC = 12 $dS.m^{-1}$ for all rice genotypes at seedling stage. Molecular screening for 10 SSR linked marker showed that they amplified 60 alleles among rice genotypes. We identified four SSR markers which significantly co-segregated with at least one trait that was involved in salinity tolerance including; RM315 with seedling height, RM223 with root dry weight and seedling height, RM3627 with root dry weight, seedling height and RWC; and RM8094 with root dry weight and RWC. Molecular data clustering through UPGMA method and Yule coefficient also classified rice genotypes into five major clusters with tolerance to susceptible reactions. As three aforementioned SSR markers; RM315, RM3627 and RM8094 are located on chromosome 1, closely linked to *Saltol* QTL, and co-segreated with different traits in this experiment, they could be employed to differentiate salinity tolerant rice genotypes in rice breeding programs in Iran.

Key words: Genetic diversity, Linked markers, Salinity stress, Microsatellite and Rice.

[Downloaded from agrobreedjournal.ir on 2026-11-25]

[DOR: 20.1001.1.15625540.1397.20.4.6.5]

Received: February, 2018 Accepted: January, 2019

1. Graduated MSc. Student, Zanjan University, Zanja, Iran
2. Associate Prof., Rice Research Institute of Iran, Mazandaran Branch, Amol. Agricutural Research, Education and Extension (AREEO), Iran (Corresponding author)(Email: amoumeni@areeo.ac.ir)
3. Assistant Prof., Rice Research Institute of Iran, Rasht. Agricutural Research, Education and Extension (AREEO), Iran
4. Professor, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran, Karaj, Iran