



## بررسی تنوع ژنتیکی و اثر تنش شوری بر تعدادی از خصوصیات فیزیولوژیک در لاین‌های جهش‌یافته گندم نان

عاطفه رحمانی کمرودی<sup>۱</sup>، سعید نواب‌پور<sup>۲\*</sup>، احد یامچی<sup>۳</sup>، علی اصغر نصرا... نژاد قمی<sup>۴</sup>

۱. دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده تولید گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

۲. دانشیار گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده تولید گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

۳. استادیار گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده تولید گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

تاریخ دریافت: ۹۷/۰۸/۲۸؛ تاریخ پذیرش: ۹۷/۱۰/۱۵

### چکیده

هدف از این آزمایش بررسی تنوع ژنتیکی لاین‌های موتانت گندم (T-65-7-1 و T-67-60) و والد (طبیسی) با استفاده از نشانگر مولکولی RAPD و همچنین مقایسه برخی شاخص‌های مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی بین لاین‌های موتانت و والد در پاسخ به تنش شوری در مرحله گیاهچه‌ای بود. در این تحقیق دو لاین موتانت گندم (T-65-7-1 و T-67-60) به همراه رقم والد آن‌ها (رقم طبیعی)، در محیط هیدروپونیک یوشیدا در شرایط روشنایی (۱۶ ساعت روشنایی) و دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار کشت شدند. پس از اعمال تنش شوری در شرایط هدایت الکتریکی EC۶ = دسی‌زیمنس بر متر، وزن تر و وزن خشک گیاهچه‌ها به‌عنوان صفات مورفولوژیک اندازه‌گیری شدند. همچنین نمونه‌های برگی جهت استخراج DNA و ارزیابی پارامترهای بیوشیمیایی (میزان پروتئین، پروتئین و کلروفیل) برداشت گردیدند. تنوع ناشی از جهش القایی حاصل از پرتوگاما در گندم به کمک آغازگر مولکولی RAPD آشکار و تأیید شد. الگوی حاصل از نشانگر RAPD نشان‌دهنده تشابه بیشتر لاین موتانت T-67-60 با رقم والد طبیعی بود. مقایسه میانگین‌ها داده‌های مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی حاکی از آن بود که لاین‌های موتانت نسبت به والد از تحمل نسبی بالاتری در شرایط تنش شوری برخوردار بودند. در مجموع، برتری معنی‌دار صفات مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی مرتبط با تحمل به شوری در لاین‌های موتانت (T-65-7-1 و T-67-60) در مقایسه با رقم والد (طبیسی) علاوه بر اهمیت کاربردی، مبین اثرگذاری جهش و موفقیت روند انتخاب طی نسل‌های تفکیک بود

واژه‌های کلیدی: تنش شوری، فیزیولوژی، گندم موتانت، مورفولوژی، نشانگر RAPD

### مقدمه

دانه تحت تأثیر قرار می‌دهد (Naidoo and Naidoo, 2001). پاسخ گیاهان به تنش شوری بسیار پیچیده است و اثرات سوء تنش شوری تنها بر یک مرحله رشدی گیاه نبوده بلکه می‌تواند با توجه به شدت تنش، نوع تنش و میزان مقاومت متفاوت باشد. پاسخ به تنش شوری در گیاهان به‌صورت چندزنی است، به‌طوری‌که از طرق مختلف برای مقابله با آن عمل می‌کند. اولین پاسخ سلول‌ها در طی تنش شوری، عدم

شوری یکی از مهم‌ترین عوامل محیطی محدودکننده تولیدات کشاورزی است (Su et al., 2003) در بین گیاهان زراعی گندم نان مهم‌ترین محصول کشاورزی جهان به‌شمار می‌رود. گندم نان به‌عنوان گیاه نیمه متحمل به شوری معرفی شده است (Munns, 2002). افزایش شوری در خاک باعث کاهش رشد و میزان محصول می‌گردد. شوری تمام فرایندهای اصلی مانند رشد، فتوسنتز، سنتز پروتئین و متابولیسم لیپید و انرژی و در نتیجه، تمام مراحل گیاه را از جوانه‌زنی تا تولید

تبادل پتانسیل اسمزی ناشی از فرونی نمک است. برای نگره-داری پتانسیل اسمزی سلول‌ها، یک اسمولیت یا محافظت‌کننده‌های اسمزی نیاز است، از جمله پرولین که در غلظت‌های بالا بدون ایجاد اختلال فضای درون‌سلولی و با حفظ فعالیت آنزیم‌ها این نقش را ایفا می‌کند (Sabir et al., 2012). به‌طوری‌که در زمان وقوع تنش، گیاه با افزایش سنتز اسیدهای آمینه پرولین باعث حفظ فشار آماس و ادامه رشد سلول می‌گردد (Mc Kersia and Leshem, 1994). نتایج برخی از مطالعات نشان داده است، نقش سازگاری پرولین به ادامه بقای گیاه مربوط می‌شود (Aspinall and Paleg, 2000). همچنین بررسی الگوی پروتئینی ارقام گندم تحت تنش شوری نشان داد که سنتز برخی پروتئین‌ها افزایش یا کاهش یافته که این تفاوت‌ها احتمالاً به دلیل فعالیت ژن‌های دخیل در سازگاری گیاه با شرایط شور است (Metwali et al., 2011).

یکی از جنبه‌های بسیار مهم مقاومت به شوری تجمع محلول‌های سازگار کننده (مانند قندهای محلول و پرولین) برای برقراری تعادل یونی سیتوپلاسم در واکوئل است. گیاهان حساس اغلب چنین ظرفیتی را ندارند و فرایندهای متابولیکی آن‌ها به علت عدم تعادل یونی و تنش خشکی مختل می‌شود. از آنجاکه کلروزه شدن یکی از نتایج رشد گیاه در تنش شوری است، بررسی تجمع کلروفیل در گیاهان تحت تنش شوری فرایند مناسبی برای مطالعه اثرات متابولیکی تنش شوری است. تنش شوری منجر به تخریب ساختار کلروپلاست و ناپایداری مجموعه‌های پروتئین رنگ‌دانه می‌شود (Abdelkader et al., 2007). تخریب ساختار کلروپلاست‌ها و کاهش میزان کلروفیل دلیل فعالیت بیشتر کلروفیل‌از است. همچنین کاهش مقدار کلروفیل می‌تواند به دلیل تغییر متابولیسم نیتروژن در رابطه با ساخت ترکیب‌هایی نظیر پرولین باشد که در تنظیم اسمزی به کار می‌رود. بنابراین میزان کلروفیل و به دنبال آن مشخصات فلورسانس کلروفیل تحت تأثیر شوری قرار می‌گیرند. با بررسی اثر شوری بر روی میزان کلروفیل در گندم گزارش شده است که کاهش کلروفیل a و b در ارقام متحمل به مراتب کمتر از ارقام حساس به شوری است (Rout and Das, 2003).

دو راه مقابله با مشکل شوری وجود دارد، راه اول اصلاح خاک‌های شور و راه دیگر تولید و معرفی ارقام زراعی متحمل به شوری است. روش اول بسیار پرهزینه و زمان‌بر است و ماندگاری بالایی ندارد. همچنین اصلاح تمام خاک‌ها تحت

تأثیر شوری امکان‌پذیر نیست. روش دوم دارای پایداری بالا، تأثیر بیشتر و هزینه کمتر است. روش‌های اصلاحی گیاهان برای تحمل به شوری شامل افزایش میزان عملکرد واریته‌های متحمل به شوری و انتقال ژن‌های متحمل به شوری به ارقام دارای عملکرد بالا است (Ramezanpour and Soltanloo, 2010). یکی از روش‌های اصلاحی کلاسیک، اصلاح از طریق جهش، جهت ایجاد خصوصیات مطلوب در محصولات زراعی است. استفاده مستقیم از تکنیک‌های هسته‌ای جهت ایجاد جهش یکی از مهم‌ترین راه‌های دست‌یابی به این هدف است و به‌عنوان تحولی جدید در تحقیقات کشاورزی، به‌خصوص در حفاظت و اصلاح نباتات و تولید موتانت‌های جدید مورد توجه قرار گرفته است و کاربرد آن‌ها به‌عنوان فناوری تثبیت‌شده جهت اصلاح ارقام جدید است (Khan et al., 2003).

روش‌های مختلفی برای بررسی اثر مواد جهش‌زا روی گیاهان قابل‌دسترسی می‌باشد. در میان آن‌ها نشانگرهای مولکولی به دلیل فراوانی زیاد آن‌ها در ژنوم، عدم تأثیرپذیری از شرایط محیط مناسب بوده و مقایسه اثرات جهش روی ژنوتیپ‌ها را در سطح DNA فراهم می‌کند و می‌توان از آن‌ها جهت ردیابی تغییرات به‌دست‌آمده از اعمال تیمار جهش استفاده نمود. همچنین نشانگرهای مناسب و قابل‌اعتماد، انتخاب طی مدت‌زمان کمتر را در افراد حامل ژن‌های موردنظر ممکن می‌سازند (Gupta et al., 2010). با استفاده از نشانگر مولکولی می‌توان ژن‌های درگیر در مقاومت به شوری را در گیاهان شناسایی کرد و با گزینش ژنوتیپ‌های مقاوم به شوری می‌توان به اصلاح و توسعه این گیاهان در مناطق شور اقدام کرد. از آنجایی‌که نشانگرها مولکولی چندشکلی را در سطح DNA شناسایی می‌کنند و به مطالعه تفاوت ژنتیکی در بسیاری از گونه‌های زراعی می‌پردازند، ابزاری مهم برای شناسایی دقیق اثرات پرتوگاما محسوب می‌شوند (Barakat et al., 2010). در بین نشانگرهای مختلف، نشانگرهای مبتنی بر تکثیر تصادفی چندشکلی DNA (Random Amplified Polymorphic DNA, RAPD) به دلیل عدم نیاز به اطلاعات اولیه در مورد توالی ژنوم، امکان غربال سریع و مؤثر توالی بر اساس چندشکلی در تعداد زیادی مکان و عدم نیاز به مواد DNA رادیواکتیو، در مطالعات ژنتیک جمعیت و تعیین تنوع، به‌طور گسترده‌ای مورد استفاده قرار گرفته‌اند (Farsi and Bagheri, 2004). نشانگرهای RAPD دارای قدرت تمایز بیشتری نسبت به نشانگرهای مورفولوژیک و پروتئینی هستند (Smith and

سپس در فویل آلومینیومی پیچیده و به مدت ۴۸ ساعت در آون ۷۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. پس از خشک شدن کامل گیاهچه‌ها، وزن خشک اندازه‌گیری شد. در مرحله بعد، نمونه‌های برگ جهت استخراج DNA و بررسی میزان پرولین، پروتئین، کلروفیل برداشت گردیدند.

تمامی مواد موردنیاز برای انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمرز از شرکت سیناژن (واقع در تهران) خریداری شد. استخراج DNA از بافت برگ با استفاده از روش Doyle CTAB (Doyle and Doyle, 1987) انجام شد. برای تعیین کیفیت و کمیت DNA استخراجی به ترتیب از الکتروفورز ژل آگارز ۰/۸ درصد با بافر (TAE 1X) و دستگاه NanoDrop استفاده شد. DNA استخراج شده با استفاده از بافر TE تا ۵۰ برابر رقیق شد. از DNA رقیق شده جهت تکثیر از طریق PCR استفاده شد. در این آزمایش از ۲۹ آغازگر ده نوکلئوتیدی با توالی تصادفی استفاده گردید (جدول ۱).

اجزای واکنش PCR برای حجم ۲۵ میکرولیتر شامل بافر PCR یک برابر، کلرید منیزیم ۲/۵ میلی مولار، آغازگر ۵ میلی مولار، Taq DNA پلیمرز ۲/۵ واحد، دزوکسی نوکلئوتید ۰/۲ میلی مولار و DNA الگو ۵ میلی مولار و آب دو بار تقطیر بود. این واکنش در دستگاه ترموسایکلر مدل peQ STAR Thermocycler صورت گرفت. به منظور تکثیر قطعات DNA، چرخه PCR به این شرح انجام شد: چرخه واسرشته سازی اولیه در ۹۵°C به مدت ۵ دقیقه، ۴۰ چرخه با واسرشته سازی در ۹۴°C به مدت یک دقیقه، اتصال آغازگر به رشته الگو در ۳۶°C به مدت یک دقیقه و بسط آغازگر در ۷۲°C به مدت ۲ دقیقه و تکمیل بسط در ۷۲°C به مدت ۱۰ دقیقه. برای تفکیک فراورده‌های PCR حاصل از تجزیه RAPD، الکتروفورز ژل آگارز ۱/۵ درصد در بافر (TBE 1X) با ولتاژ ۸۰ ولت و به مدت ۴ ساعت انجام شد. از فراورده‌های تکثیرشده در زیر نور UV توسط دستگاه Gel documentation عکس‌برداری شد. هر واکنش دو بار تکرار گردید و فقط نوارهایی که به طور ثابتی تکرار شده بودند، جهت تجزیه و تحلیل مورد استفاده قرار گرفت.

برای اندازه‌گیری میزان پرولین از روش بیتس و همکاران (Bates et al., 1973) استفاده شد. میزان ۰/۱ گرم از بافت برگ تازه پودر شده را به همراه ۱۰ میلی‌لیتر اسید سولفوسالسیلیک سه درصد مخلوط شد. سپس سانتریفیوژ محلول به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۳ هزار دور در دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد انجام گردید. بعد از اتمام سانتریفیوژ، دو

(Smith, 1992)، زیرا نشانگرهای DNA علاوه بر تفاوت‌های توالی‌های کد کننده، اختلافات بین توالی‌های غیر کد کننده ژنوم را نیز آشکار می‌سازند (Cho et al., 1999). بر اساس گزارش‌ها، نشانگر RAPD در بررسی‌های تنوع ژنتیکی گیاهان موتانت مورد استفاده قرار گرفته است (Taryono et al., 2009; Hoang et al., 2011).

هدف از این آزمایش بررسی تنوع ژنتیکی لاین‌های موتانت گندم (T-65-7-1 و T-67-60) و والد (طیسی) با استفاده از نشانگر RAPD و همچنین مقایسه برخی شاخص‌های مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی بین لاین‌های موتانت و والد در پاسخ به تنش شوری در مرحله گیاهچه‌ای بود.

### مواد و روش‌ها

تعداد سه ژنوتیپ گندم نان شامل رقم طیسی به عنوان والد و دو لاین جهش‌یافته پیشرفته پرتو تابی شده با استفاده از پرتوگاما با دوز ۳۰۰ گری و متعلق به نسل M6 با نام‌های T-65-7-1 و T-67-60 (Asadi and Naserian Khiabani, 2007)، کشت شدند. رقم طیسی از گندم‌های بومی ایران و متحمل به خشکی است (Bagherikia et al., 2017). ژنوتیپ‌های مورد استفاده در این مطالعه، از موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج و سازمان انرژی اتمی ایران (پژوهشکده تحقیقات کشاورزی، پزشکی و صنعتی واقع در کرج) تهیه گردید.

در ابتدا بذور برای داشتن گیاهچه‌های عاری از هرگونه آلودگی ضدعفونی شدند. سپس بذور روی کاغذ صافی مرطوب درون پتری‌دیش در شرایط تاریک انکوباتور به مدت سه روز در دمای  $24 \pm 1$  درجه سانتی‌گراد کشت شدند. پس از آن انتقال گیاهچه‌ها در محیط مایع یوشیدا (Yoshida et al., 1976) به روش هیدروپونیک در شرایط روشنایی (۱۶ ساعت روشنایی) و دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد انجام گرفت. آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار (هر تکرار شامل پنج بذر) تحت تنش شوری NaCl (با هدایت الکتریکی ۶ دسی زیمنس بر متر) به همراه تیمار شاهد (محلول یوشیدا) انجام شد. انتخاب سطح شوری ۶ دسی زیمنس بر متر بر اساس گزارش قبلی از القای شوری در ژنوتیپ‌های مورد مطالعه، صورت گرفت (Nouri et al., 2015). بعد از گذشت ۱۵ روز، وزن تر و خشک گیاهچه‌ها با استفاده از ترازوی Sartorius با دقت ۴-۱۰ وزن گردیدند،

۵۲۰ نانومتر در دستگاه اسپکتروفوتومتر (Uvikon - Kontron) خوانده شد. برای محاسبه میزان پرولین در نمونه‌ها، ابتدا میزان شدت جذب نوری غلظت‌های ۵۰ تا ۳۰۰ میکرو مولار پرولین خالص تهیه‌شده از شرکت Roche (پرولین استاندارد) در ۵۲۰ نانومتر اندازه‌گیری شد و بر اساس معادله خط رگرسیون بین مقدار پرولین‌های استاندارد و شدت جذب نوری آن‌ها، منحنی استاندارد تهیه و مقدار پرولین موجود در بافت گیاهان محاسبه گردید.

میلی لیتر محلول نین هیدرین (شامل ۱/۲۵ گرم نین هیدرین در ۳۰ میلی لیتر اسید استیک که پس از حل شدن با حرارت، ۲۰ میلی لیتر اسید اورتوفسفوریک به آن اضافه شد) مخلوط و به مدت یک ساعت در حمام آب گرم با دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. پس از این مدت برای جلوگیری از ادامه واکنش، لوله‌ها در مخلوط آب و یخ به مدت ۱۰ دقیقه قرار گرفتند. بعد از هم‌دم شدن با محیط، چهار میلی لیتر تولوئن به نمونه‌ها اضافه شد. پس از انجام ورتکس، جذب در

جدول ۱. توالی آغازگرهای RAPD مورد استفاده در ژنوتیپ‌های مورد مطالعه

| Table 1. Sequences of RAPD primers used in the studied genotypes |         |               |        |         |               |
|------------------------------------------------------------------|---------|---------------|--------|---------|---------------|
| شماره                                                            | آغازگر  | توالی         | شماره  | آغازگر  | توالی         |
| Number                                                           | Primer  | Sequence      | Number | Primer  | Sequence      |
| 1                                                                | GSC- 01 | TGC TCT GCC C | 16     | GSC- 16 | CCG ATA TCC C |
| 2                                                                | GSC- 02 | GGT GAC GCA G | 17     | GSC- 17 | TGC CCG TCG T |
| 3                                                                | GSC- 03 | TCC GCT CTG G | 18     | GSC- 18 | GGT AGC AGT C |
| 4                                                                | GSC- 04 | GAA GCC AGC C | 19     | GSC- 19 | GGT CCT CAG G |
| 5                                                                | GSC- 05 | CAG TGC CGG T | 20     | GSC- 20 | CAG TTC GAG G |
| 6                                                                | GSC- 06 | ACC GGC TTG T | 21     | GSC- 21 | TAC CGA CAC C |
| 7                                                                | GSC- 07 | CAG ACT GGT C | 22     | GSC- 22 | ACT CAG GAG C |
| 8                                                                | GSC- 08 | AGG CCA GAG G | 23     | GSC- 23 | CCA CCG CCA G |
| 9                                                                | GSC- 09 | GGA GCC TCA G | 24     | GSC- 24 | AGA GAT GCC C |
| 10                                                               | GSC- 10 | GAC TAG GTG G | 25     | GSC- 25 | CAG TTC TGG C |
| 11                                                               | GSC- 11 | GGG AAT TCG G | 26     | GSC- 26 | AGC CAG CGA A |
| 12                                                               | GSC- 12 | TGC TGC AGG T | 27     | GSC- 27 | AAT CGG GCT G |
| 13                                                               | GSC- 13 | AGG GCG TAA G | 28     | GSC- 28 | AGG GGT CTT C |
| 14                                                               | GSC- 14 | GTC CTC AAC G | 29     | GSC- 29 | CAG GCC CTT C |
| 15                                                               | GSC- 15 | GGA CAC CAC T |        |         |               |

دور در دقیقه در مدت زمان ۱۵ دقیقه، میزان جذب مایع رویی در طول موج‌های ۶۴۷ و ۶۶۴ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر ثبت گردید. میزان کلروفیل a (chl a) و کلروفیل b (chl b) بر اساس فرمول‌های زیر محاسبه شدند:

$$\text{Chla (mg.ml}^{-1}\text{)} = 12.25\text{A}_{664} - 2.55\text{A}_{647} \quad [۱]$$

$$\text{Chlb (mg.ml}^{-1}\text{)} = 20.31\text{A}_{647} - 4.91\text{A}_{664} \quad [۲]$$

### آنالیز آماری

پس از تهیه عکس از ژل آگارز، ابتدا ماتریس صفر و یک بر اساس مشاهده باند (۱) و عدم مشاهده باند (۰) با استفاده از نرم‌افزار NTedit 1.1b تهیه شد و جهت تجزیه و تحلیل داده‌ها از نرم‌افزار آماری NTSYS pc 2.02 استفاده گردید. برای آنالیزهای آماری شامل تجزیه واریانس و مقایسه میانگین‌ها از نرم SAS استفاده گردید. مقایسه میانگین‌ها به روش آزمون

اندازه‌گیری میزان پروتئین به روش برادفورد (Bradford, 1976) انجام شد. برای اندازه‌گیری پروتئین، ۰/۰۵ گرم از برگ وزن گردید و ۴ میلی لیتر از بافر تریس اسیدکلریدریک به آن اضافه شد. سپس نمونه‌ها روی شیکر به مدت ۲۰ دقیقه ورتکس گردیدند. سپس به مدت ۳۰ دقیقه در ۵۰۰۰ دور سانتریفیوژ گردیدند و فاز بالایی (حاوی پروتئین کل) جدا گردید. برای اندازه‌گیری پروتئین به روش برادفورد به ۰/۱ میلی لیتر عصاره پروتئینی از هر نمونه ۵ میلی لیتر محلول برادفورد اضافه شد و سپس به مدت ۲۰ دقیقه ورتکس گردیده و سپس جذب در طول موج ۵۹۵ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر خوانده و یادداشت گردید.

برای اندازه‌گیری کلروفیل از روش پورا و همکاران (Porra et al., 1989) استفاده گردید. مقدار ۰/۵ گرم نمونه برگ (به صورت منجمد) کاملاً خرد و با ۱۰ میلی لیتر استون ۸۰ درصد به حجم رسانیده شد. پس از سانتریفیوژ با دور ۱۳۰۰۰

LSD انجام گرفت و سطح احتمال به کاررفته در کلیه تجزیه و تحلیل ها ۵٪ در نظر گرفته شد.

## نتایج و بحث

### نتایج بررسی مولکولی

مجموع ۲۹ آغازگر مورد استفاده در این مطالعه ۱۷۴ باند قابل امتیازدهی ایجاد کردند که اندازه آن ها در محدوده ۲۵۰۰-۲۰۰ جفت بازی تخمین زده شد. بیشترین تعداد قطعه تکثیر شده ۱۵ باند و مربوط به آغازگر GSC-16 و کمترین قطعه تکثیر شده یک باند و مربوط به آغازگر GSC-03 بود، در بین ۲۹ آغازگر استفاده شده، تنها سه آغازگر GSC-01، GSC-06 و GSC-12 چند شکلی نشان دادند (جدول ۲). آغازگر GSC-01 تنها یک باند چند شکل در محدوده ۹۰۰ جفت بازی نشان داد (شکل ۱). با توجه به شکل عدم حضور باند ۹۰۰ جفت بازی را در لاین موتانت T-65-7-1 و

حضور این باند در والد طبعی و لاین جهش یافته T-67-60 قابل رؤیت است. آغازگر GSC-06 که بیشترین تعداد چند شکلی را نشان داد، در موقعیت ۳۲۰ جفت بازی تنها در لاین موتانت T-67-60 باند مشاهده شد (شکل ۱). همچنین در موقعیت ۳۱۰ جفت بازی هیچ باندی مربوط به لاین موتانت T-67-60 مشاهده نشد. در محدوده بازی ۳۰۰ جفت، الگوی باندها در لاین موتانت T-67-60 و والد طبعی مشابه بود. در آغازگر GSC-12، چند شکلی مشاهده شده در محدوده بازی تقریباً ۱۰۲۰ جفت باز دیده شد که حضور این باند در لاین موتانت T-65-7-1 قابل رؤیت و عدم حضور این باند در والد طبعی و لاین موتانت T-67-60 قابل مشاهده شد (شکل ۱). در مجموع بر اساس نتایج به دست آمده، تنوع ناشی از جهش القایی حاصل از پرتوگاما در گندم به کمک آغازگر مولکولی RAPD آشکار و تأیید گردید. علاوه بر این، الگوی حاصل از نشانگر RAPD نشان دهنده تشابه بیشتر لاین موتانت T-67-60 با رقم والد طبعی بود.

جدول ۲. درجه چند شکلی و اطلاعات مربوط به آغازگرهای استفاده شده در ژنوتیپ های بررسی شده

Table 2. The degree of polymorphism and information of primers used in the studied genotypes

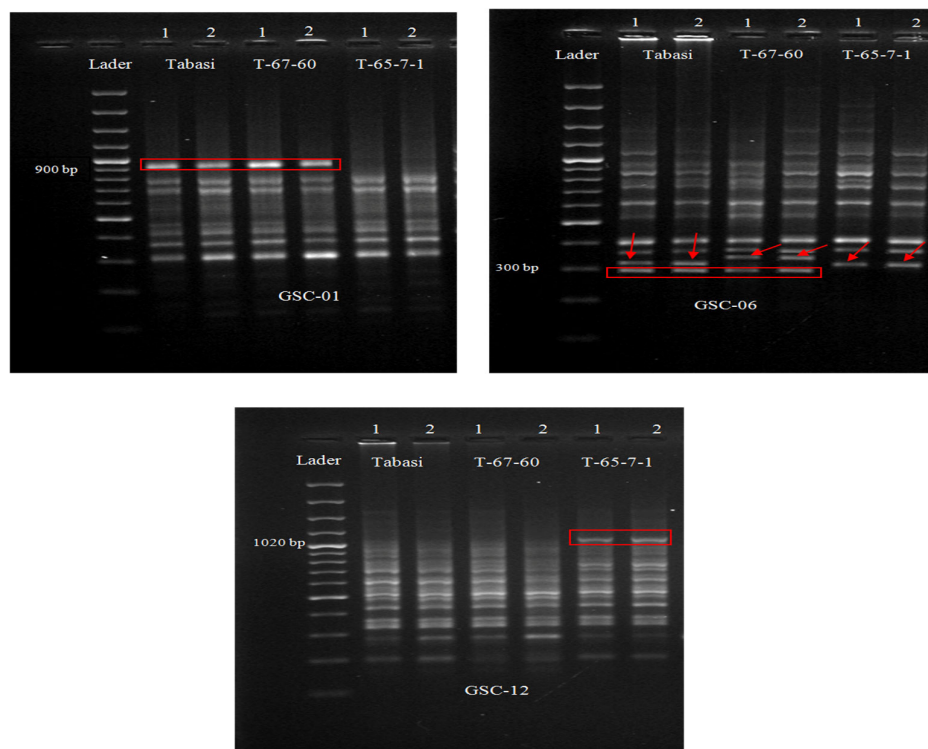
| شماره<br>Number | آغازگر<br>Primer | مجموع قطعات<br>Total fragment | تعداد قطعه چند شکل<br>Number of polymorphic bands | درصد چند شکلی<br>Percentage of polymorphism |
|-----------------|------------------|-------------------------------|---------------------------------------------------|---------------------------------------------|
| 1               | GSC- 01          | 7                             | 1                                                 | 14.2                                        |
| 2               | GSC- 06          | 9                             | 3                                                 | 33.3                                        |
| 3               | GSC- 12          | 11                            | 1                                                 | 9.09                                        |
| Total           | کل               | 27                            | 5                                                 | 56.59                                       |

ژنتیکی میان لاین های موتانت و والد بررسی گردید (Babaei et al., 2011).

### نتایج بررسی های مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی

با افزایش شوری میزان شاخص های مورفولوژیکی در ژنوتیپ های مختلف تفاوت چشمگیری داشت (جدول ۳). میزان وزن تر و وزن خشک در هر سه ژنوتیپ کاهش یافت و بیشترین کاهش در رقم طبعی مشاهده گردید (شکل ۲). کاهش ماده خشک گیاه در شرایط تنش شوری به موجب کاهش سطح برگ و افت میزان فتوسنتز حادث می گردد (Ashraf and Foolad, 2005). از این رو در تحقیق حاضر، وجود تنوع در کاهش میزان ماده خشک نشان دهنده تفاوت آستانه تحمل ژنوتیپ ها است.

بررسی تنوع ژنتیکی حاصل از موتاسیون القایی از طریق مارکرهای مولکولی روشی مناسب برای تأیید جهش های رخ داده در ژنوم موجودات زنده است. تارینو و همکاران (Taryono et al., 2011) شناسایی تغییرات موتاژنی در سورگوم با استفاده از نشانگر مولکولی RAPD را انجام دادند. نتایج حاصل از بررسی آن مطالعه نشان داد که بین لاین های موتانت و ولد اختلاف معنی داری وجود داشت. هوانگ و همکاران (Hoang et al., 2009) تغییرات تنوع ژنتیکی در موتانت های برنج در اثر پرتو تابی گاما با استفاده از نشانگرهای مولکولی RAPD و RAMP مورد ارزیابی قرار دادند. نتایج آن ها تنوع ژنتیکی حاصل از پرتو تابی را لاین های موتانت تأیید کرد. همچنین در مطالعه ای بر روی برنج، بر اساس الگوی تنوع ژنتیکی لاین های موتانت و والد، میزان تشابه



شکل ۱. قطعات تکثیرشده توسط آغازگرهای GSC-01، GSC-06 و GSC-12 بر روی ژل آگارز.

Fig. 1. Example of amplified fragments by GSC-01, GSC-06 and GSC-12 primers on agarose gel

جدول ۳. نتایج تجزیه واریانس داده‌های شاخص‌های مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی در ژنوتیپ‌های گندم.

Table 3. The results of variance analysis of morphological and physiological parameters in wheat genotypes

| منابع تغییرات<br>Sources of variation | درجه آزادی<br>Df | Mean squares         |                       |                            |                            | میانگین مربعات    |                      |
|---------------------------------------|------------------|----------------------|-----------------------|----------------------------|----------------------------|-------------------|----------------------|
|                                       |                  | وزن تر<br>Wet weight | وزن خشک<br>Dry weight | کلروفیل a<br>Chlorophyll a | کلروفیل b<br>Chlorophyll b | پرولین<br>Proline | پروتئین<br>Protein   |
| ژنوتیپ<br>Genotype (G)                | 2                | 0.025**              | 0.15**                | 50.445**                   | 7.653**                    | 18.90**           | 2.3417**             |
| سطح شوری<br>Salinity levels (S)       | 1                | 0.023**              | 0.001**               | 26.601**                   | 10.129**                   | 142.9**           | 13.7636**            |
| ژنوتیپ × سطح شوری<br>S × G            | 2                | 0.019**              | 0.002**               | 0.981**                    | 0.606**                    | 34.63**           | 0.7818 <sup>ns</sup> |
| خطا<br>Error                          | 12               | 0.005                | 0.0004                | 0.890                      | 0.668                      | 1.17              | 0.2594               |
| CV (%)                                | ضریب تغییرات (%) | 8.45                 | 3.64                  | 27.18                      | 11.81                      | 14.50             | 4.94                 |

<sup>ns</sup> و \*\* به ترتیب غیر معنی‌دار و معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد.

<sup>ns</sup> and \*\* respectively non-significant and significant at 1% probability level.

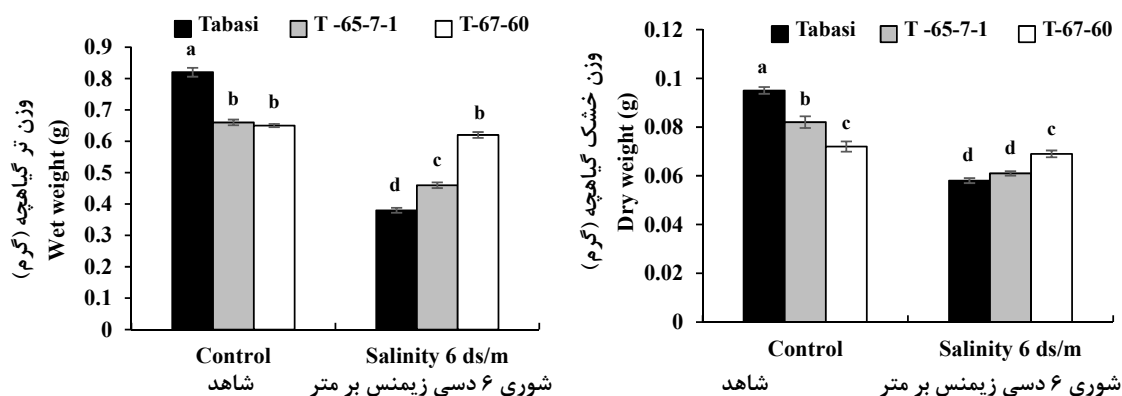
که این افزایش نیز معنی‌دار گردید و بیشترین افزایش مربوط به لاین موتانت T-67-60 و کمترین میزان افزایش در رقم طبسی حاصل شد (شکل ۳). در شرایط تنش شوری، پرولین در حفظ ساختار غشاء ایجاد سازگاری اسمزی و حفظ ساختار

بین تیمارهای مختلف از نظر میزان پرولین اختلاف معنی‌داری وجود داشت (جدول ۳). بیشترین میزان پرولین در سطح شاهد مربوط به لاین موتانت T-67-60 بود. با اعمال تنش شوری میزان پرولین در هر سه ژنوتیپ افزایش داشت

بر متر، میزان پروتئین در لاین‌های موتانت بیشتر از والد طبسی ولی بین موتانت‌ها اختلاف معنی‌داری نبود. با اعمال تنش شوری میزان پروتئین برگ در هر سه ژنوتیپ افزایش داشت ولی میزان افزایش در لاین‌های موتانت بیشتر بود، با این حال افزایش بین لاین‌های موتانت معنی‌دار نشد (شکل ۳). پروتئین‌هایی که در گیاهان تحت تنش شوری، تجمع می‌یابند، به عنوان ذخایری از نیتروژن در تنظیم اسمزی نقش دارند. در پاسخ به تنش شوری ممکن است پروتئین‌ها به طور جدید ساخته شوند و یا این که به طور نهادی در غلظت‌های پائین وجود داشته و هنگامی که گیاهان در معرض شوری قرار می‌گیرند، غلظت آن‌ها افزایش یابد (Ashraf and Harris, 2004). تعمیر و ترمیم آسیب حاصل از تنش برای بقا سلول در سطوح مهار متابولیسمی در تنش‌های اسمزی یا یونی ضروری است. این راه‌کارها ممکن است سازگاری اسمزی و فیزیولوژیکی دیگر مانند تغییر در رشد ریشه و بخش‌های هوایی و نیز تعرق را در برگ‌برد که حاکی از سنتز مجدد پروتئین‌ها، تحت تنش شوری است (Chinnusamy et al., 2006). همچنین محتوای بالای پروتئین‌های محلول را در ارقام متحمل به شوری جو، آفتابگردان و برنج گزارش نمودند (Ashraf and Harris, 2004).

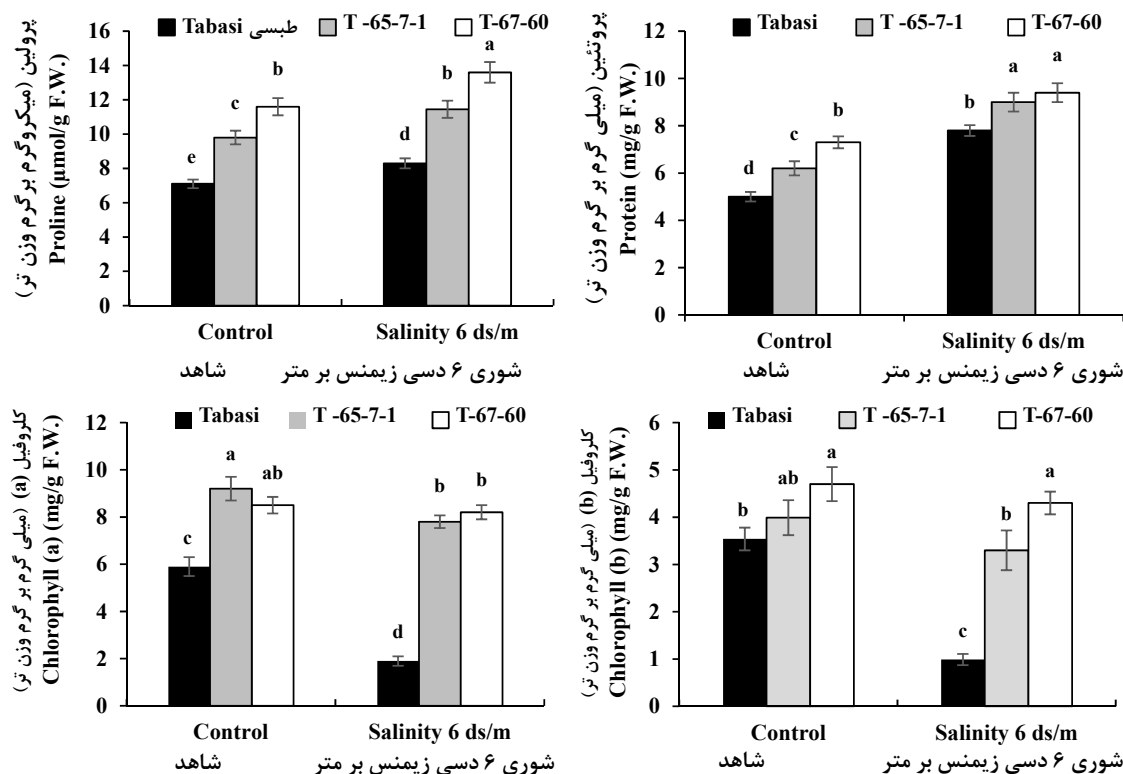
آنزیم‌ها در سلول ایفای نقش می‌کند (Najaphy et al., 2010). تنظیم اسمزی، اثر حمایتی سلول، عمل آنتی‌اکسیدانی، انتقال انرژی، ذخیره کربن و نیتروژن و چندین نقش دیگر که برای پایداری سلول و انتقال از یک حالت به حالت سازگاری جدید لازم است را برای پرولین برشمردند. پرولین بر حلالیت بسیاری از پروتئین‌ها اثر می‌گذارد و می‌تواند آن‌ها را از تخریب در شرایط تنش پرتودهی محافظت نماید (Irigoyen et al., 1992). برزویه و همکاران (Borzouei et al., 2011; 2013) افزایش میزان پرولین گندم را در دوز ۲۰۰-۳۰۰ گری و در گیاه برنج در دوز ۳۰۰ گری گزارش نمودند. همچنین مکوی و همکاران (Macovei et al., 2014) افزایش میزان پرولین در دوزهای بالاتر از ۲۰۰ گری در گیاه برنج را گزارش کردند. تریچانت و همکاران (Trinchant et al., 2004) افزایش پرولین را تحت تأثیر تنش شوری در اندام‌های مختلف گیاه یونجه گزارش کرد.

نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد، مقدار پروتئین برگ در ژنوتیپ‌های مختلف، تفاوت معنی‌دار در سطح یک درصد داشتند (جدول ۳). در شرایط بدون تنش میزان پروتئین در لاین‌های موتانت بیشتر از والد طبسی بود. همچنین میزان پروتئین در لاین موتانت T-67-60 بیشتر از T-65-7-1 بود (شکل ۳). در سطح شوری ۶ دسی زیمنس



شکل ۲. تأثیر شوری بر روی میزان وزن تر و وزن خشک. حروف مشابه بیانگر عدم تفاوت معنی‌دار و حروف غیرمشابه بیانگر تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال پنج درصد.

Fig. 2. The effect of salinity on the wet weight and dry weight. Similar letters indicate no significant difference and dissimilar letters indicate significant differences at the 5% probability level.



شکل ۳. تأثیر شوری بر روی میزان پرولین، پروتئین، کلروفیل (a) و کلروفیل (b). حروف مشابه بیانگر عدم تفاوت معنی‌دار و حروف غیرمشابه بیانگر تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال پنج درصد

Fig. 3. The effect of salinity on proline, protein, (a) chlorophyll and (b) chlorophyll content. Similar letters indicate no significant difference and dissimilar letters indicate significant differences at the 5% probability level

در اثر تنش شوری کاهش معنی‌داری در میزان کلروفیل a و b حاصل شد، همچنین میزان کاهش کلروفیل b نسبت به کلروفیل a بیشتر بود (جدول ۳). تیمار شوری منجر به کاهش میزان کلروفیل a گردید. بیشترین میزان کلروفیل a مربوط به لاین موتانت T-67-60 بود. باین‌حال در تیمار شوری میان دو لاین موتانت تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد (شکل ۳). در اثر تنش شوری میزان کلروفیل a و b در لاین‌های موتانت (T-65-7-1 و T-67-60) و والد (طبسی) کاهش یافت. باین‌وجود میزان کاهش در لاین‌های موتانت کمتر از والد طبسی بود (شکل ۳). احتمالاً افزایش فعالیت آنزیم کلروفیلاز در عکس‌العمل به تنش شوری منجر به کاهش رنگیزه‌ها گردیده و از طرف دیگر هورمون‌های بازدارنده رشد از قبیل هورمون آبسزیک اسید و اتیلن که در شرایط تنش شوری افزایش می‌یابند، در افزایش فعالیت این آنزیم نقش داشته و موجب تخریب بیشتر کلروفیل شده است

### نتیجه‌گیری نهایی

در این تحقیق تنوع ناشی از جهش القایی حاصل از پرتوگاما در گندم به کمک آغازگر مولکولی RAPD آشکار و تأیید شد. مجموع پلی‌مورفیسم مشاهده‌شده برای سه آغازگر GSC-01،

بیانگر وجود تنوع ژنتیکی برای این صفات است. همچنین مقایسه میانگین‌ها نشان داد که لاین‌های جهش‌یافته از نظر میزان کلروفیل، پروتئین و پروتئین نسبت به والد خود برتر بودند. وجود لاین‌های برتر از نظر این صفات در شرایط شوری، حائز اهمیت است. بر اساس این تحقیق مشخص گردید که جهش القایی پرتوگاما تأثیر مطلوبی در ایجاد لاین‌های موتانت با خصوصیات مطلوب داشته است.

GSC-06 و GSC-12 نشان داد که لاین موتانت T-67-60 تشابه ژنومی بیشتری با رقم والد طبسی دارد. علاوه بر این، نشانگرهای مورد استفاده در این آزمایش به طور قابل توجهی ژنوتیپ‌های والد و جهش‌یافته را از همدیگر تشخیص دادند؛ بنابراین استفاده از این آغازگرها که چندشکلی قابل قبولی را در گندم نشان دادند توصیه می‌شود. تفاوت صفات مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی در شرایط شوری در لاین‌های موتانت (T-67-60 و T-65-7-1) و رقم مادری (طبسی)

### منابع

- Abdelkader, A.F., Aronsson, H., Sundqvist, C., 2007. High salt-stress in wheat leaves (*Triticum aestivum*) causes retardation of chlorophyll accumulation due to a limited rate of protochlorophyllide formation. *Journal of Physiology Plantarum*. 130, 157-166.
- Asadi, A.A., Naserian Khiabani, B., 2007. Evaluation of salt tolerance based on morphological and yield traits in wheat cultivars and mutants. *International Journal of Agriculture and Biology*. 9, 693-700.
- Ashraf, M., Foolad, M., 2005. Pre Sowing Seed Treatment—A Shotgun Approach to Improve Germination, Plant Growth, and Crop Yield Under Saline and Non Saline Conditions. *Advances in Agronomy*. 88, 223-271.
- Ashraf, M., Harris, P.J.C., 2004. Potential biochemical indicators of salinity tolerance in plants. *Plant Science*. 160, 3-16.
- Ashraf, M.Y., Ali, Q., 2008. Relative membrane permeability and activities of some antioxidant enzymes as the key determinants of salt tolerance in canola (*Brassica napus* L.). *Environmental and Experimental Botany*. 63, 266-273.
- Aspinall, D., Paleg, L.G., 2000. Proline accumulation: physiological aspects. In: Paleg, L.G., Aspinall, D. (eds.), *The Physiology and Biochemistry of Drought Resistance in Plants*. New York, USA: Academic Press, 1981.
- Bagherikia, S., Pahlevani, M., Yamchi, A., Zenalinezhad, K., Mostafaie, A., 2017. Effect of drought stress on the expression of genes involved in synthesis and hydrolysis of fructan during remobilization of assimilates in wheat root. *Plant Genetic Researches*. 4, 39-50.
- Barakat, M.N., Abdel Fattah, R.S., Badr, M., El-Torky, M.G., 2010. In vitro mutagenesis and identification of new variants via RAPD markers for improving *Chrysanthemum morifolium*. *African Journal of Agricultural Research*. 5, 748-757.
- Bates, L.S., Waldren, R.P., Teare, L.D., 1973. Rapid determination of free proline for water stress studies. *Plant and Soil*. 39, 205-208.
- Borzouei, A., Kafi, M., Majd Abadi, A., 2011. The effect of gamma radiation on some biochemical mechanisms of two wheat genotypes (*Triticum aestivum* L.) under greenhouse conditions. *Journal of Greenhouse Culture Science and Technology*. 5, 75-85. [In Persian with English summary].
- Borzouei, A., Kafi, M., Sayahi, R., Rabiei, E., Sayad amin, P., 2013. Biochemical response of two wheat cultivars (*Triticum aestivum* L.) To gamma radiation pak. *American Journal of Botany*. 2, 473-477.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72, 248-254.
- Chinnusamy, V., Zhu, J., Zhu, J.K., 2006. Salt stress signaling and mechanisms of plant salt tolerance. *Genetic Engineering*. 27, 141-177.
- Datta, J.K., Lng, S., Banerjee, A., Mondal, N.K., 2009. Impact of salt stress on five varieties of wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars under laboratory condition. *Journal of Applied Sciences and Environmental Management*. 3, 93-97.
- Farsi, M., Bagheri, A.R., 2004. *Principle of Plant Breeding*. (5th edition). Jihad University (Mashhad). 380p. [In Persian].

- Gupta, V.K., Sharma, R., Jindal, V., Dilawari, V.K., 2010. SCAR markers for identification of host plant specificity in whitefly, *Bemisia tabaci* (Genn.). *Indian Journal of Biotechnology*. 9, 360-366.
- Hoang, T.M.L., Filippis, L.F.D., Le, X.T., 2009. Salt tolerance and screening for genetic changes in rice mutants after gamma irradiation using rapid and microsatellite (RAMP) markers. *The Open Horticulture Journal*. 2, 62-69.
- Irigoyen, J.J., Emerich, D.W., Sanchez-diaz, M., 1992. Water stress induced change in concentration of proline and total soluble sugars in nodulated alfalfa (*Medicago sativa*) plants. *Physiologia Plantarum*. 84, 55-60.
- Khan, A.A., Rao, S.A., McNeilly, T., 2003. Assessment of salinity tolerance based upon seedling root growth response functions in maize (*Zea mays* L.). *Euphytica*, 131, 81-89.
- Macovei, A., Garg, B., Raikwar, S., Balestrazzi, A., Carbonera, D., Buttafava, A., Tuteja, N., 2014. Synergistic exposure of rice seeds to different doses of-ray and salinity stress resulted in increased antioxidant enzyme activities and gene-specific modulation of tennar pathway. *BioMed Research*. 15p. international.  
<http://dx.doi.org/10.1155/2014/676934>.
- Mc Kersia, B.D., Leshem, Y.Y., 1994. Stress and stress coping in cultivated plants. Kluwer Academic Publishers, the Netherlands, 256p.
- Metwali, E., Eid, M.H., Bayoumi, T.Y., 2011. Agronomical traits and biochemical genetic markers associated with salt tolerance in wheat cultivars (*Triticum aestivum* L.). *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*. 5, 174-183.
- Munns, R., 2002. Comparative physiology of salt and water stress. *Plant, Cell and Environment*. 25, 659-671.
- Naidoo, G., Naidoo, Y., 2001. Effects of salinity and nitrogen on growth, ion relations and proline accumulation in *Triglochin bulbosa*. *Wetlands Ecology and Management*. 9, 491-497.
- Najaphy, A., Khamssi, N.N., Mostafaie, A., Mirzaee, H., 2010. Effect of progressive water deficit stress on proline accumulation and protein profiles of leaves in chickpea. *African Journal of Biotechnology*. 9, 7033-7036.
- Nouri, H., Navabpour, S., Yamchi, A., Zeyae, F., 2015. Differential response of parent and advanced mutant lines of wheat (*Triticum aestivum* L. cv. Tabasi) genotypes in antioxidant activity to salinity stress at seedling stage. *Second Conference on New Findings in the Environment and Agricultural Ecosystems*. 6, 133-147. [In Persian].
- Porra, R.J., Thompson, W.A., Kriedmann, P.E., 1989. Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls a and b extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta*. 3, 384-394.
- Ramezanpour S.S. Soltanloo H. 2010. Advanced Plant Breeding. Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources Press. 218p. [In Persian].
- Rout, G.R., Das, P., 2003. Effect of metaltoxicity on plant growth and metabolism. *Agronomy Journal*. 23, 3-11.
- Sabir, F., Sangwan, R., Kumar, R., Sangwan, N., 2012. Salt stress induced responses in growth and metabolism in callus cultures and differentiating in vitro shoots of Indian Ginseng (*Withania somnifera* Dunal). *Journal of Plant Growth Regulation*. 31, 537-548. DOI 10.1007/s00344-012-9264-x.
- Smith, J.S.C., Smith, O.S., 1992. Fingerprinting crop varieties. *Advances in Agronomy*. 47, 140-149.
- Su, H., Balderas, E., Vera-Estrella, R., Gollack, D., Quigley, F., Zhao, C., Pantoja, O., Bohnert, H.J., 2003. Expression of the cation transporter MCHKT1 in halophyte. *Plant Molecular Biology*. 52, 967-980.
- Taryono, T., Cahyaningrum, P., Human, S., 2011. The Detection of Mutational Changes in Sorghum using RAPD. *Indonesian Journal of Biotechnology*. 16, 66-70.
- Trinchant, J., Boscari, A., Spennato, G., Van de Sybe, G., Le Rudulier, D., 2004. Proline Betaine Accumulation and Meta boismine, Alfalfa Plants under Sodium Chlorid. *Stress. Plant Physiology*. 135, 1583-1594.
- Yoshida, S., Forno, A., Cock, J.H., Gomez, K.A., 1976. Laboratory manual for physiological studies of rice. Los Boas. Filipinas. 83p.



*Original article*

## Genetic variation and effects of salinity stress on a number of physiological characteristics in bread wheat mutant lines

A. Rahmani-Kamrodi<sup>1</sup>, S. Navabpuor<sup>2\*</sup>, A. Yamchi<sup>3</sup>, A.A. Nasrolahnejad-Ghomi<sup>3</sup>

1. Postgraduate Plant Breeding and Biotechnology Department, Faculty of Plant Production, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran

2. Associate Professor, Plant Breeding and Biotechnology Department, Faculty of Plant Production, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran

3. Assistant Professor, Plant Breeding and Biotechnology Department, Faculty of Plant Production, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran

Received 19 March November; Accepted 5 January 2018

### Abstract

The purpose of this experiment was study on genetic variation of wheat mutant lines (T-67-60 and T-65-7-1) and its parent (Tabasi cultivar) using RAPD molecular marker and also compare some biochemical parameters of salinity tolerance between the mutant lines and the parent in response to salt stress in the seedling stage. In this study, two mutant lines of wheat (T-67-60 and T-65-7-1) with its parent (Tabasi cultivar), cultured in the Yoshida hydroponics at 30 °C and lighting condition (16 hours of light). Then salinity stress induced on wheat seedling at electrical conductivity 6 dS m<sup>-1</sup> and leaf samples were collected for DNA extraction and evaluation of biochemical parameters (proline, protein and chlorophyll content). The pattern of RAPD marker showed more similarity of line mutant T-67-60 with parent (Tabasi cultivar). The results of biochemical parameters showed that mutant lines (T-67-60 and T-65-7-1) were higher tolerance than parent (Tabasi cultivar) under salinity stress. Variability of mutations induced by gamma radiation in wheat revealed and verified with molecular RAPD primers. In addition, differences in biochemical characteristics under salinity condition in the mutant lines (T-67-60 and T-65-7-1) and the parent (Tabasi) implies genetic variation for these traits.

**Keywords:** Morphology, Mutant wheat, Physiology, RAPD marker, Salinity stress

\*Correspondent author: Saeed Navabpuor; E-Mail: [s.navabpour@yahoo.com](mailto:s.navabpour@yahoo.com).