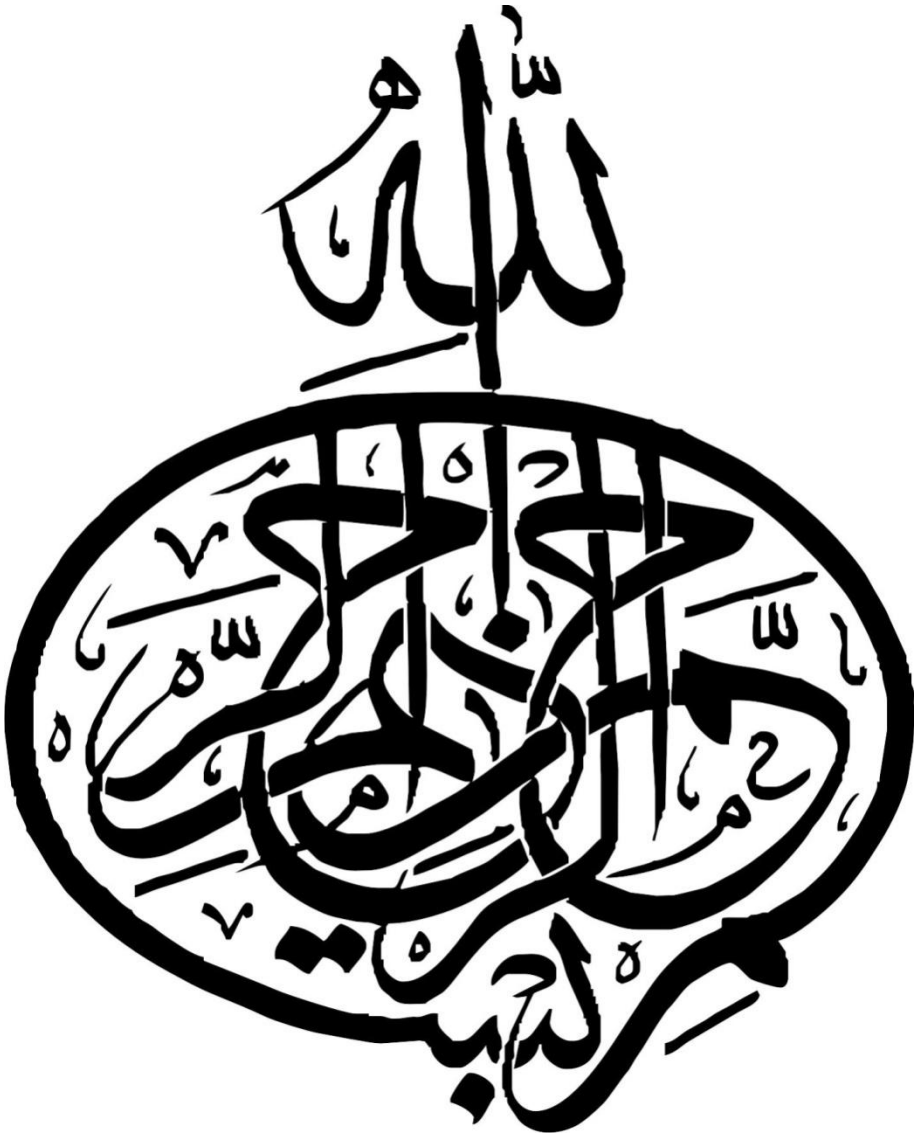

دانشکده علوم کشاورزی
گروه بیوتکنولوژی کشاورزی
(گرایش بیوتکنولوژی در کشاورزی)

مطالعه تظاهر ژن‌های مقاومت به شوری در ارقام مقاوم و حساس برنج (*Oryza sativa* L.)

از:
هما ایزددوست

استاد راهنما:
دکتر حبیب الله سمیع زاده لاهیجی

استادان مشاور:
دکتر بابک ربیعی
مهندس شاپور عبداللهی

اسفند ۱۳۹۱

چنان‌چه شایسته باشد

هدیه می‌کنم به

پدر و مادر مهربانم

به پاس موهبت حضور، همراهی بی‌دریغ و محبت بی منّتشان.

سپاسگزاری

سپاسم از آن خداست که همواره بهترین‌ها را به من بخشید
و
شکرگزار ابدی او هستم که گرمای مهر مادر، پدر و برادر عزیزم را در زندگیم تاباند
و
قدردان او هستم که فرصت بهره جستن از رهنمودهای اساتید بزرگواری همچون

جناب آقای دکتر حبیب الله سمیع زاده لاهیجی
جناب آقای دکتر بابک ربیعی
جناب آقای مهندس شاپور عبداللهی
جناب آقای دکتر محمد مهدی سوهانی
جناب آقای دکتر سید حسن حسنی
جناب آقای دکتر رضا شیرزادیان

را به من عطا نمود.
همچنین سپاسگزار او هستم که همدلی دوستان خوبم
خانم‌ها

نیلوفر آقائی‌پور- سولماز کیوان‌پژوه، مینا خوشبخت و زهره ولیزاده

را به من هدیه کرد.
امیدوارم همراهی پروردگار و لطف روزگار همواره برای خانواده، اساتید و دوستانم برقرار باشد.

فهرست مطالب

عنوان	صفحه
چکیده فارسی	خ
چکیده انگلیسی	د
مقدمه	۱
فصل اول– کلیات ومرور منابع	۴
۱-۱- برنج	۵
۱-۲- تنش	۵
۱-۳- شوری	۶
۱-۳-۱-اثر شوری بر گیاهان و پاسخ به آن	۶
۱-۳-۲- اثر شوری بر برنج	۸
۱-۴- ورود یون سدیم به گیاه	۹
۱-۵- انتقال سدیم	۱۱
۱-۶-جذب آپوپلاستی سدیم در برنج	۱۱
۱-۷-هموستازی یون‌ها پس از رویارویی گیاه با تنش	۱۲
۱-۷-۱- هموستازی پتاسیم	۱۳
۱-۷-۲- تسهیم و هموستازی سدیم	۱۴
۱-۷-۳- هموستازی کلسیم	۱۶
۱-۸- پیام‌رسانی تنش	۱۶
۱-۸-۱- دریافت‌کننده‌های تنش	۱۷
۱-۸-۲- سیگنالینگ کلسیم	۱۷
۱-۸-۳- حسگرهای کلسیم	۱۸
۱-۸-۳-۱-کالمادولین	۱۸
۱-۸-۳-۲- پروتئین های مشابه کلسینئورین	۱۹
۱-۸-۳-۳- پروتئین کینازهای وابسته به کلسیم	۲۱
۱-۸-۴-مسیرهای انتقال پیام به هسته پس از فعال شدن حسگرهای کلسیمی	۲۲
۱-۸-۴-۱-مسیر MAPK	۲۲
۱-۸-۴-۱- مسیر SOS	۲۳
۱-۹- بیان ژن‌ها در تنش	۲۵
۱-۱۰-بررسی بیان ژن در تنش	۲۶
۱-۱۰-۱- DDRT PCR	۲۶

۱-۲-۱۰- Real time PCR	۲۷
۱-۱۱- *OsNHX1* و *OsCIPK24*، دو ژن واکنش‌گر به تنش	۲۸
۱-۱۲-گزینش ارقام متحمل به شوری	۳۱
فصل دوم– مواد و روش‌ها	۳۴
۲-۱- ارزیابی تحمل به شوری در ژنوتیپ‌های برنج	۳۵
۲-۱-۱- ضدعفونی و جوانه‌دار کردن بذور	۳۵
۲-۱-۲- کشت بذور	۳۶
۲-۱-۲-۱- آماده‌سازی صفحات کشت	۳۶
۲-۱-۲-۲- آماده‌سازی محلول یوشیدا	۳۷
۲-۱-۳- اعمال تیمارهای شوری در مرحله ارزیابی ژنوتیپ‌ها	۳۹
۲-۱-۴- ارزیابی فنوتیپی واکنش گیاهچه‌ها پس از اعمال تیمارهای شوری	۳۹
۲-۱-۵- ارزیابی ژنوتیپی	۴۱
۲-۱-۵-۱- استخراج DNA	۴۲
۲-۱-۵-۲-بررسی کیفیت و کمیت DNA	۴۲
۲-۱-۵-۳- تکثیر DNA استخراج شده در PCR	۴۳
۲-۱-۵-۴- نحوه آماده‌سازی ژل آکریل‌آمید	۴۴
۲-۱-۵-۵- آنالیز داده‌های مولکولی	۴۵
۲-۲- بررسی تظاهر ژن‌های مقاومت به شوری	۴۶
۲-۲-۱- ضدعفونی، جوانه‌دار کردن و کشت بذور	۴۷
۲-۲-۲- اعمال تیمار شوری به منظور بررسی چگونگی بیان ژن‌های مورد نظر	۴۷
۲-۲-۳- نمونه‌گیری از گیاهچه‌ها برای استخراج RNA	۴۷
۲-۲-۴- استخراج RNA	۴۷
۲-۲-۵- بررسی کیفیت و کمیت RNA	۴۸
۲-۲-۶- ساخت cDNA	۴۹
۲-۲-۷- کنترل سنتز و کیفیت cDNA	۵۰
۲-۲-۸- بررسی بیان ژن با روش DDRT PCR	۵۲
۲-۲-۹- بررسی بیان ژن با روش Real time PCR	۵۳
فصل سوم– نتایج و بحث	۵۵

۳-۱- ارزیابی فنوتیپی ژنوتیپ‌ها ۵۶
۳-۱-۱- محاسبه آماره‌های توصیفی (شاخص‌های تمایل مرکزی و پراکندگی) ۵۶
۳-۱-۲- تجزیه واریانس صفات و بررسی امتیاز مربوط به ژنوتیپ‌ها حاصل از ارزیابی فنوتیپی ۵۹
۳-۱-۲-۱- مقایسه میانگین اثرات متقابل شوری و ژنوتیپ ۶۰
۳-۱-۲-۲- مقایسه میانگین اثرات ساده ژنوتیپ‌ها بر صفات ۶۴
۳-۱-۳ ضرایب همبستگی فنوتیپی بین صفات مورد مطالعه ۶۷
۳-۱-۴- تجزیه خوشه‌ای ژنوتیپ‌های مورد مطالعه بر مبنای صفات اندازه‌گیری شده ۶۹
۳-۱-۵- تجزیه تابع تشخیص ۷۴
۳-۱-۶- شاخص‌های تحمل ۷۹
۳-۱-۷- نتیجه کلی ارزیابی فنوتیپی ۸۶
۳-۲- ارزیابی مولکولی ژنوتیپ‌ها ۸۸
۳-۲-۱- تعداد باند مشاهده شده و درصد چندشکلی نشانگرهای SSR ۸۸
۳-۲-۲- آلل تهی ۸۹
۳-۲-۳- محتوای اطلاعات چند شکل (PIC) نشانگرهای SSR ۸۹
۳-۲-۴- محتوای اطلاعات چند شکل (PIC)، تنوع ژنی نی و شانون در نشانگرهای SSR ۹۰
۳-۲-۵- همبستگی بین شاخص‌های تنوع برای نشانگرهای SSR ۹۱
۳-۲-۶- فاصله ژنتیکی و تجزیه خوشه‌ای ۹۱
۳-۲-۷- تجزیه تابع تشخیص ۹۳
۳-۲-۸- تجزیه به مختصات اصلی (PCO) ۹۵
۳-۲-۹- مقایسه نتایج خوشه‌ای حاصل از نشانگر مولکولی و تجزیه خوشه‌ای حاصل از صفات مورفولوژیک ۹۶
۳-۲-۱۰- تعیین قابلیت نشانگرهای مورد استفاده برای انتخاب ژنوتیپ‌های حساس و متحمل (MAS) ۹۷
۳-۳ بررسی بیان ژن‌های واکنش‌گر به تنش شوری ۹۹
۳-۴- نتیجه کلی ۱۰۶
۳-۵- پیشنهادها ۱۰۸
منابع ۱۰۹
پیوست ۱۲۰

فهرست جدول‌ها

عنوان	صفحه
جدول ۲-۱- ژنوتیپ‌های مورد استفاده و منشا آنها	۳۵
جدول ۲-۲- ترکیبات مورد نیاز برای تهیه محلول غذایی یوشیدا	۳۸
جدول ۲-۳- مقادیر مورد نیاز از هر استوک برای ۴ لیتر محلول یوشیدا و غلظت نهایی هر عنصر	۳۸
جدول۲-۴- چگونگی اختصاص کدهای ژنوتیپی در شرایط شوری	۴۰
جدول۲-۵- روابط مربوط به محاسبه شاخص‌های تحمل	۴۱
جدول ۲-۶- صفات مرتبط با شوری و نشان‌گرهای SSR مرتبط با آن‌ها	۴۱
جدول ۲-۷- توالی آغازگرهای پیشرو و پسرو نه نشانگر SSR	۴۲
جدول ۲-۸- ترکیبات مورد نیاز واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در ارزیابی ژنوتیپی	۴۴
جدول ۲-۹- جدول ۲-۹-غلظت و شاخص جذب نور RNA استخراج شده	۵۰
جدول ۲-۱۰- مراحل ساخت cDNA منطبق با دستورالعمل کیت سنتز	۵۲
جدول ۲-۱۱- مراحل و دوره‌های زمانی PCR و DDRT-PCR برای تکثیر cDNA توسط آغازگرهای مورد نظر	۵۳
جدول ۲-۱۲- مواد مورد نیاز برای تکثیر cDNA در واکنش PCR وDDRT-PCR	۵۳
جدول ۲-۱۳- مشخصات آغازگرهای مورد استفاده در DDRT-PCR و Real Time-PCR	۵۴
جدول۲- ۱۴- ترکیب و مقدار مواد مورد استفاده Real time PCR	۵۴
جدول ۲-۱۵- مراحل و دوره‌های زمانی Real Time PCR برای تکثیر cDNA توسط آغازگرهای مورد نظر	۵۴
جدول ۳-۱- مقادیر آماره‌های توصیفی صفات مختلف در شوری ۱,۱۹ دسی‌زیمنس بر متر (شاهد)	۵۸
جدول ۳-۲- مقادیر آماره‌های توصیفی صفات مختلف در شوری ۴ دسی‌زیمنس بر متر	۵۸
جدول ۳-۳- مقادیر آماره‌های توصیفی صفات مختلف در شوری ۸ دسی‌زیمنس بر متر	۵۹
جدول ۳-۴- مقادیر آماره‌های توصیفی صفات مختلف در شوری ۱۲ دسی‌زیمنس بر متر	۵۹
جدول ۳-۵- تجزیه واریانس صفات مختلف ژنویپ‌های برنج مورد مطالعه تحت تنش شوری	۶۰
جدول ۳-۶- مقایسه میانگین اثر متقابل شوری و ژنوتیپ در چهار سطح شوری برای صفت طول شاخساره	۶۲
جدول ۳-۷- مقایسه میانگین اثر متقابل شوری و ژنوتیپ در چهار سطح شوری برای صفت طول ریشه	۶۳
جدول ۳-۸- ضریب همبستگی صفات در شوری ۸ دسی‌زیمنس بر متر	۶۹
جدول ۳-۹- میانگین و انحراف از میانگین گروه‌های حاصل از تجزیه خوشه‌ای در شوری ۱,۱۹ ds/m (شاهد)	۷۳
جدول ۳-۱۰- میانگین و انحراف از میانگین گروه‌های حاصل از تجزیه خوشه‌ای در شوری ۴ ds/m	۷۴
جدول ۳-۱۱- میانگین و انحراف از میانگین گروه‌های حاصل از تجزیه خوشه‌ای در شوری ۸ ds/m	۷۴
جدول ۳-۱۲- میانگین و انحراف از میانگین گروه‌های حاصل از تجزیه خوشه‌ای در شوری ۱۲ ds/m	۷۴

جدول ۳-۱۳- توابع تشخیص کانونی حاصل از تجزیه خطی فیشر براساس گروه‌بندی اولیه حاصل از تجزیه خوشه‌ای در چهار سطح تنش شوری ۷۵
جدول ۳-۱۴- ارزیابی موفقیت خوشه‌بندی ژنوتیپ‌ها در سطح شاهد با استفاده از تجزیه تابع تشخیص ۷۵
جدول ۳-۱۵- ارزیابی موفقیت خوشه‌بندی ژنوتیپ‌ها در سطح ۴ ds/m با استفاده از تجزیه تابع تشخیص ۷۶
جدول ۳-۱۶- ارزیابی موفقیت خوشه‌بندی ژنوتیپ‌ها در سطح ۸ ds/m با استفاده از تجزیه تابع تشخیص ۷۶
جدول ۳-۱۷- ارزیابی موفقیت خوشه‌بندی ژنوتیپ‌ها در سطح ۱۲ ds/m با استفاده از تجزیه تابع تشخیص ۷۷
جدول ۳-۱۸- مقایسه میانگین شاخص‌های تحمل به شوری محاسبه شده برای صفت زیست توده (بیوماس رویشی) ۸۲
جدول ۳-۱۹- ضرایب همبستگی شاخص‌های تحمل به شوری و امتیاز ژنوتیپی در سطح ۸ دسی زیمنس ۸۳
جدول ۳-۲۰- مقادیر ویژه و و بردارهای مشخصه (ضرایب متغیرها) برای شاخص‌های مقاومت و عملکرد در سه سطح شوری ۸۳
جدول ۳-۲۱-نتیجه ارزیابی فنوتیپی واکنش ژنوتیپ‌ها به تنش شوری ۸۸
جدول ۳-۲۲-مقادیر محاسبه شده برای محتوای اطلاعات چند شکل، تعداد آلل موثر، تنوع ژنی نی و شانون ۹۰
جدول ۳-۲۳- ضریب همبستگی میان شاخص‌های تنوع ۹۱
جدول۳-۲۴- توابع تشخیص کانونی حاصل از تجزیه خطی فیشر براساس گروه‌بندی اولیه حاصل از تجزیه خوشه‌ای ۹۳
جدول ۳-۲۵- نسبت موفقیت قرارگرفتن ژنوتیپ‌ها در گروه‌های حاصل از تجزیه خوشه‌ای بر مبنای نشان‌گرهای SSR ۹۴
جدول ۳-۲۶- تجزیه به مختصات اصلی با استفاده از نشان‌گرهای SSR ۹۶
جدول ۳-۲۷- میزان تفکیک ژنوتیپ‌های حساس از متحمل توسط نشانگرهای SSR ۹۸
جدول ۳-۲۸- میزان بیان ژن *OsCIPK24* در روش DDRT-PCR ۹۹
جدول ۳-۲۹- میزان بیان ژن *OsNHX1* در روش DDRT-PCR ۱۰۰

فهرست شکل‌ها

عنوان	صفحه
شکل ۲-۱- بررسی کیفیت DNA ژنومی بر روی ژل آگارز ۱٪	۴۳
شکل ۲-۲- مراحل واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در مرحله ارزیابی ژنوتیپی	۴۴
شکل ۲-۳- نشانگر RM 261: (الف) ژل آگارز ۳٪ و (ب) ژل آکریلامید	۴۶
شکل ۲-۴- بررسی کیفیت RNA روی ژل آگارز ۱٪	۴۹
شکل ۲-۵- کنترل سنتز cDNA (ژل آگارز ۱٪)	۵۱
شکل ۲-۶-کنترل کیفیت سنتز cDNA با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن *GAPDH* برنج (ژل آگارز ۱٪)	۵۱
شکل ۳-۱- مقایسه میانگین اثر ساده ژنوتیپ بر وزن خشک ریشه	۶۵
شکل ۳-۲- مقایسه میانگین اثر ساده ژنوتیپ بر وزن خشک شاخساره	۶۵
شکل ۳-۳- مقایسه میانگین اثر ساده ژنوتیپ بر بیوماس رویشی	۶۶
شکل ۳-۴- مقایسه میانگین اثر ساده ژنوتیپ بر نسبت طول ریشه به شاخساره	۶۷
شکل ۳-۵- گروه‌بندی ارقام بر اساس صفات مورفولوژیک به روش Ward در سطح شاهد	۷۰
شکل ۳-۶- گروه‌بندی ارقام بر اساس صفات مورفولوژیک به روش Ward در شوری ۴ ds/m	۷۱
شکل ۳-۷- گروه‌بندی ارقام بر اساس صفات مورفولوژیک به روش Ward در شوری ۸ds/m	۷۲
شکل ۳-۸- گروه‌بندی ارقام بر اساس صفات مورفولوژیک به روش Ward در شوری ۱۲ds/m	۷۳
شکل ۳-۹- گروه‌بندی ارقام در سطح شاهد بر اساس تابع تشخیص	۷۷
شکل ۳-۱۰- گروه‌بندی ارقام در سطح ۴ ds/m بر اساس تابع تشخیص	۷۸
شکل ۳-۱۱- گروه‌بندی ارقام در سطح ۴ ds/m بر اساس تابع تشخیص	۷۸
شکل ۳-۱۲- گروه‌بندی ارقام در سطح ۱۲ ds/m بر اساس تابع تشخیص	۷۹
شکل ۳-۱۳- نمایش بای‌پلات شاخص‌ها در شوری ۸ دسی‌زیمنس بر مبنای دو مولفه اول	۸۴
شکل ۳-۱۴- دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای بر اساس روش UPGMA برای نشان‌گرهای SSR	۹۲
شکل ۳-۱۵-گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها با استفاده از نشان‌گرهای SSR بر اساس تابع تشخیص	۹۴
شکل ۳-۱۶- الگوی پراکنش دو بعدی ژنوتیپ‌ها بر اساس مولفه اول و دوم در تجزیه به مختصات اصلی با استفاده از نشان‌گرهای SSR	۹۶
شکل ۳-۱۷- بیان نسبی دو ژن *OsCIPK24* و *OsNHX1* در ژنوتیپ سپیدرود	۱۰۱
شکل ۳-۱۸- بیان نسبی دو ژن *OsCIPK24* و *OsNHX1* در ژنوتیپ حسن‌سرائی	۱۰۱
شکل ۳-۱۹- بیان نسبی دو ژن *OsCIPK24* و *OsNHX1* در لاین ۴۱۶	۱۰۲
شکل ۳-۲۰- بیان نسبی دو ژن *OsCIPK24* و *OsNHX1* در ژنوتیپ شاه‌پسند	۱۰۲
شکل ۳-۲۱- بیان نسبی دو ژن *OsCIPK24* و *OsNHX1* در ژنوتیپ IR29	۱۰۲

چکیده

مطالعه تظاهر ژن‌های مقاومت به شوری در ارقام مقاوم و حساس برنج *(Oryza sativa L.)*

هما ایزددوست

به منظور شناسایی چگونگی واکنش ژنوتیپ‌های مختلف برنج (*Oryza sativa* L.) به تنش شوری، هفده ژنوتیپ در آزمایش فاکتوریل در قالب طرح بلوک کامل تصادفی با سه تکرار، در گلخانه موسسه تحقیقات برنج کشور (رشت) در سال ۱۳۹۱مورد بررسی قرار گرفتند. کشت این ژنوتیپ‌ها به صورت هیدروپونیک و در محلول غذایی با هدایت الکتریکی ds/m ۱,۱۹ انجام و در موعد مقرر تیمارهای شوری (۴، ۸ و ۱۲ دسی‌زیمنس برمتر) برای آنها اعمال شد. ارزیابی فنوتیپی بر اساس دستورالعمل IRRI اجرا و برخی از صفات مرتبط با ریشه و شاخساره در در گیاهچه‌ها اندازه‌گیری و با هدف تعیین میزان تحمل ژنوتیپ‌ها در برابر شوری، شاخص‌های تحمل به تنش نیز برای آن‌ها محاسبه شد. پس از آن تنوع میان ژنوتیپ‌ها، با اسفاده از هشت نشانگر ریز ماهواره (SSR) وابسته به QTLهای کنترل کننده مقدار Na^+ و K^+ مورد مطالعه قرار گرفت. توانایی نشانگرها برای جداسازی ژنوتیپ‌های حساس و متحمل از یکدیگر به صورت منفرد، ترکیب دو و سه نشانگر بررسی شد. نتایج تجزیه واریانس، وجود تفاوت معنی‌دار بین ژنوتیپ‌ها را برای همه صفات نشان داد که بیانگر تنوع ژنتیکی میان آنها بود. دو ژنوتیپ شاه‌پسند و لاین ۴۱۶ بهترین عملکرد را در هر سه سطح تنش داشتند. برای نشانگرهای استفاده شده نیز، پلی مورفیسم مشاهده شد. از میان آنها RM261 بزرگترین میزان چند شکلی و شاخص های تنوع شانون و نی را به خود اختصاص داد. بررسی قدرت تفکیک ژنوتیپ‌ها توسط نشانگرها نشان داد که هر کدام از نشانگرهای RM5، RM190 و RM205 به تنهایی ۵۳,۳۳٪ ژنوتیپ‌های حساس و متحمل را تفکیک کردند. همچنین دو نشانگر RM5-RM205 ۵۳,۳۳ و سه نشانگر RM5-RM205-RM255 و RM5-RM205-RM261 هر یک ۴۰٪ ژنوتیپ‌های حساس را از دو ژنوتیپ متحمل جدا کردند. در نهایت ۲ ژنوتیپ حساس و ۲ ژنوتیپ متحمل در برابر شوری به همراه IR29 به عنوان یک رقم حساس بین‌المللی، انتخاب و بیان دو ژن *OsNHX1* و *OsCIPK24* در آنها مورد ارزیابی قرار گرفت. همچنین میزان بیان ژن‌های مورد بررسی نیز بین ژنوتیپ‌ها متفاوت از یکدیگر بود.

واژه‌های کلیدی: ارزیابی فنوتیپی، بیان ژن، تنش شوری، تنوع ژنتیکی، نشانگرهای ریزماهواره

Abstract

Monitoring the expression levels of salt stress induced genes in resistant and susceptible rice (*Oryza sativa* L.).

Homa Izaddoost

To investigate rice genotypes reaction to salt stress, seventeen rice genotypes (*Oryza sativa* L.) were assessed at vegetative growth stage in a factorial experiment based on randomized complete block design with three replicates in the greenhouse of the Rice Research Institute of Iran (RRII), Rasht, Iran, in 2012. The seeds of studied genotypes were sown in hydroponic system using (1.19, 4,8 and 12 ds/m)nutrient solution and IRRI standard protocoles followed to evaluate salinity tolerance and some of the traits which are associated with the roots and shoots, werw scored in the seedling stage and stress tolerant attributes were calculated to determine the response of genotypes to stress. Then, the genetic diversity within genotypes characterized using 8 microsatellite markers (SSR) linked to QTLs controlling Na+ and K+ uptake. Also the powers of simplex, duplex and triplex SSR markers to isolate sensitive and tolerant genotypes were examined. Finally two salt tolerant and two salt sensitive genotypes with IR29 as an international salt sensitive cultivar were selected to study of *OsNHX1* and *OsCIPK24* genes, which are involved in the response to salinity stress. Analysis of variance showed that there were significant differences among genotypes for concerned characteristics, indicating the existence of genetic variation among them. Shahpasand and line 416 were the best genotypes among 3 salinity levels. The markers show polymorphism and RM261 had the maximum of PIC value, Shannon′s diversity index and Nie′s gene diversity. According to investigations RM5, RM 190 and RM205 could separate 53.33% susceptible genotypes from tolerant genotypes, lonely and RM5-RM205 binary compound was separated 53.33%. Also RM5-RM205-RM261 and RM5-RM205-RM255 ternary compounds could separate 40% of susceptible genotypes. The expression levels of genes among genotypes were different too.

Key words**:** Gene expression, Genetic diversity, Microsatellite markers, Phenotypic screening, Salt stress.

مقدمه

برنج گیاهی با تنوع ژنتیکی و توان سازگاری زیاد است. گونه زراعی مهم آن *Oryza sativa* (۲n =۲۴) بوده [اخوت و دانش وکیلی، ۱۳۷۶] و فرمول ژنومی آن AA می‌باشد[ارزانی، ۱۳۸۳]. برنج غذای اصلی بیش از نیمی از مردم جهان است و با افزایش تقاضا در دهه‌های اخیر تولید جهانی این غله افزایش یافته است [Siahpoosh et al., 2011] . این گیاه عموما در مناطق معتدل و به صورت غرقاب کشت می‌شود [اخوت و دانش وکیلی، ۱۳۷۶]. با افزایش استفاده از زمین های مردابی یرای تولید برنج در کشورهای در حال توسعه، نیاز به بهبود این گیاه در جهت تحمل به تنش‌های مواد مصرفی که با قلیایی شدن خاک و خسارت شوری یا کمبود روی، آهن و فسفر ایجاد می‌شود، ضروری است [ارزانی، ۱۳۸۳].

تنش‌های غیر زنده، عامل مهم کاهش ۷۱ درصدی محصولات زراعی در سطح جهان بوده که این مقدار برای تنش شوری ۲۰ درصد تخمین زده می شود [کافی و همکاران، ۱۳۸۶]. عناصر معدنی برای رشد گیاهان لازم هستند اما وجود نمک بیش از حد برای اغلب گیاهان مضر است. بیش از ۸۰۰ ملیون هکتار از زمین‌ها در دنیا تحت تاثیر شوری قرار دارند[Munns, 2005]. شوری به شرایطی از خصوصیات خاک گفته می‌شود که غلظت نمک‌های محلول در آن ۴ دسی‌زیمنس بر متر یا بیشتر باشد [کافی و همکاران، ۱۳۸۶]. غلظت بالای نمک‌ها سبب عدم تعادل یونی و تنش اسمزی در گیاهان شده و معمولا در پی آن، تنش ثانویه همچون خسارت اکسیداتیو نیز رخ می‌دهد [Zhu, 2001]. در شرایط غرقابی، خاک‌ها شور بوده و گیاهان دیگری غیر از برنج نمی‌توانند در این شرایط رشد کنند. در تولید برنج، شوری بعد از خشکی دومین مشکل عمده و عامل محدود کننده تولید آن محسوب می‌شود [Gregorio et al., 1997]. عمده مشکل شوری برای گیاهان عالی به دلیل مقادیر بیش از حد NaCl است [کافی و همکاران، ۱۳۸۶]. مقاومت به شوری، به رشد گیاه برنج در محیط‌های شور و اشباع از NaCl یا سایر نمک‌ها کمک می‌کند [Gregorio et al., 1997].

ارقام برنج در مرحله جوانه‌زنی به تنش شوری مقاوم بوده ولی از نظر توانایی جوانه‌زنی متفاوت هستند. تنش شوری می-تواند سبب تاخیر در جوانه‌زنی بعضی از ارقام شود، ولی در میزان نهایی آن اثر ندارد، اگر چه در برخی دیگر درصد جوانه‌زنی نیز کاهش می‌یابد [Akbar and Yabuno, 1974]. این گیاه در اوایل دوره گیاهچه‌ای (۳ برگی) به شوری خیلی حساس بوده و مجددا در مرحله رشد رویشی مقاوم می‌گردد. در مرحله گرده افشانی و لقاح نیز به شوری حساس شده و در دوره رسیدن دانه به صورت قابل توجهی مقاوم‌تر می‌گردد [به نقل از فتوکیان و همکاران، ۱۳۸۳].

گیاهان راهکارهای فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی زیادی برای غلبه بر شرایط نامناسب دارند [Shinozaki et al., 2000] و در پاسخ به تنش‌ها، ترکیبات مختلفی تولید می‌کنند که نیاز به بررسی و شناخت کامل آنها وجود دارد [Wu et al., 2005]. مکانیزم‌های مولکولی مقاومت به تنش‌های غیرزیستی بر پایه فعالیت و تنظیم ژن‌های خاصی استوار است[Wang et al.,

2003]. وجود مکانیزم‌های کارآمدتر در برابر تنش شوری در گیاه مقاوم، باعث مقاومت سریع‌تر و پایداری بیشتر آن نسبت به ارقام حساس می‌شود [Kawasaki et al., 2001].

محصول ژن‌های فعال شده در تنش به دو گروه طبقه‌بندی می‌شوند که شامل پروتئین‌های عملکردی برای مقاومت به تنش‌ها (مثل آنزیم‌های سم زدا، پروتئین‌های مرتبط با بیوسنتز مواد تنظیم کننده اسمزی و کربوهیدرات‌ها) و پروتئین‌های تنظیم کننده انتقال پیام و بیان ژن‌های مرتبط با تنش (مثل فاکتورهای رونویسی) هستند [Rabbani et al., 2003; Wu et al., 2005]. به عبارت دیگر، دریافت و انتقال پیام تنش به واسطه حضور ترکیبات پیام رسان، بخش مهمی از پاسخ گیاه در برابر شرایط نامساعد را تشکیل می‌دهد که حاصل فعال شدن ژن‌های مرتبط با تنش بوده و به دنبال انتقال این پیام‌ها و با فعالیت گروهی دیگر از ژن‌ها، پروتئین‌های مختلفی سنتز می‌شوند که در انجام واکنش‌های متابولیکی و فیزیولوژیکی گوناگون دخیل هستند [Shinozaki et al., 2000]. مونز [2005] نیز ژن‌های افزاینده مقاومت به شوری را در سه گروه ژن‌های دخیل در انتقال پیام شوری، ژن‌های دارای فعالیت اسمزی و حمایتی و ژن‌های موثر در رشد سریع‌تر گیاه درون خاک‌های شور، دسته بندی کرده است. ربانی و همکاران [2003]، فعال شدن ۵۷ ژن را در برنج طی تنش شوری گزارش نمودند. شناخت ژن-های مرتبط با تنش علاوه بر اینکه به اطلاعات ما در مورد مکانیزم‌های مولکولی مقاومت به تنش شوری می‌افزاید، برای تولید گیاهان مقاوم به شوری همچون برنج‌های مقاوم نیز مفید است [Wu et al., 2000].

با توجه به ساحلی بودن زمین‌های کشت برنج در ایران و از جمله دو استان مهم گیلان و مازندران و نیز آبیاری مزارع برنج با منابع سطحی به خصوص رودخانه‌ها و در نتیجه وجود املاح زیاد در آب آبیاری ، مراحل رشد این گیاه تحت تاثیر شوری املاح خاک می‌باشد که این امر برای ارقام حساس به شوری مشکلاتی ایجاد می‌کند. از این‌رو کشت ارقام مقاوم به تنش شوری در این مناطق می‌تواند به حفظ عملکرد و پتانسیل تولید این گیاه کمک نماید. این تحقیق به منظور بررسی شناسایی ژنوتیپ‌های متحمل به تنش شوری و بررسی چگونگی تظاهر ژن‌های دخیل در تحمل به شوری انجام شد که می‌تواند مقدمه-ای برای تولید ارقام متحمل به شوری برنج و دستیابی به عملکرد بیشتر و پایدارتر باشد.

فصل اول

کلیات و مرور منابع

۱-۱- برنج

برنج گیاهی متعلق به خانواده Gramineae بوده و جنس *Oryza*.*Oryzae* شامل بیست گونه متفاوت می‌باشد که در این میان تنها دو گونه .*Oryza sativa* L و *Oryza glaberrima* (برنج آسیایی و برنج آفریقایی)، زراعی هستند. امروزه کشت *Oryza sativa* به دلیل پتانسیل تولید محصول بیشتر، افزونی یافته [Wopereis et al,2009] و این گیاه پس از گندم دومین غله مهم دنیاست. برنج محصول فصل گرم بوده و عمدتا در مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری دنیا کشت می‌شود [ارزانی، ۱۳۸۳].

در سال ۲۰۰۹، ۱۵۸ میلیون هکتار از زمین‌های زراعی در بیش از صد کشور دنیا زیر کشت برنج قرار گرفت. میزان تولید سالانه این گیاه بیش از ۷۰۰ میلیون تن است که ۹۰ درصد آن (در حدود ۶۴۰ میلیون تن)، در آسیا تولید می‌شود (IRRI).

O. Sativa گونه ای دیپلوئید با ۲۴ کروموزوم و فرمول ژنومی AA می‌باشد. این گیاه یک‌ساله دارای شاخساره مدور و تو خالی، برگ‌های مسطح ، گل آذین خوشه انتهایی و ریشه افشان و کم عمق است [Chand and Bardenas, 1965]. چرخه زندگی برنج شامل ده مرحله جوانه‌زنی، گیاهچه ای، پنجه‌زنی، طویل شدن میان‌گره، خوشه‌زنی، نمو خوشه، گل‌دهی، شیری، خمیری و بلوغ است. این ده مرحله در سه فاز رویشی، زایشی و بلوغ قرار می‌گیرند [Wopereis et al, 2009].

فاز رویشی با ظهور ریشه‌چه و کلئوپتیل که نشانه جوانه‌زنی دانه برنج است، آغاز گشته و با طی مرحله جوانه زنی و طویل شدن میان‌گره به پایان می‌رسد. فاز زایشی شامل دو مرحله خوشه‌زنی و نمو خوشه بوده و متناسب با رقم و فصل کشت بین ۳۰ تا ۳۵ روز طول می‌کشد. در این دوره گیاه تحت تاثیر فتوپریود نبوده اما به دمای پائین، خشکی و شوری حساس است و این عوامل می‌توانند منجر به عقیمی شوند. سومین فاز زندگی برنج که در حدود ۳۰ روز به طول می‌انجامد، از مرحله گلدهی به بعد را در بر می‌گیرد [Wopereis et al, 2009].

۱-۲- تنش

محیط‌های طبیعی دربردارنده تنش های زیستی و غیرزیستی برای گیاهان است. گیاهان دائما در برابر تغییرات محیطی قرار دارند و چنانچه این تغییرات شدت و سرعت زیادی داشته باشند، آنها را به عنوان تنش تلقی می‌کنند .[Ciarmiello et al., 2011]. در گزارش سال ۲۰۰۷ فائو ذکر شده است که تنها ۳,۵٪مناطق دنیا تحت تاثیر فشارهای محیطی قرار ندارد.

لویت [۱۹۸۰] تنش را به عنوان عامل محیطی غیرمطلوب برای ارگانیسم‌ها و مقاومت را به عنوان توانایی ادامه حیات ارگانیسم در این شرایط نامساعد تعریف نموده است. هرچند که در گیاهان زراعی علاوه بر ادامه حیات، توانایی تولید بخش

قابل برداشت یا محصول نهائی نیز حائز اهمیت است [Cramer et al., 2011] .تنش‌های غیرزنده، مهم‌ترین عامل مهم کاهش ۷۱ درصدی محصولات زراعی در سطح جهان هستند [کافی و همکاران، ۱۳۸۶]. در واقع تنش غیرزیستی همان شرایط محیطی کاهنده رشد و محصول تا زیر سطوح اپتیمم است. پاسخ گیاهان به این تنش‌های دینامیک، پیچیده و قابل بازگشت یا غیرقابل بازگشت بوده و به نوع بافت یا ارگانی که تحت تنش قرار گرفته، بستگی دارد [Cramer et al., 2011].

معمولا چند تنش غیرزیستی به صورت هم‌زمان با یکدیگر رخ می‌دهند. برای مثال دمای زیاد یا تابش بیش از اندازه فوتون‌های نوری اغلب به همراه کاهش میزان آب در دسترس رخ می‌دهد که می‌تواند با اثر سمیت مواد معدنی موجود در خاک و اطراف ریشه گیاه، تشدید شود. بنابراین یک تنش غیرزیستی می‌تواند توانایی گیاه برای مقابله با تنش ثانویه را نیز کاهش دهد [Tester and Bacic, 2005].

۱-۳- شوری

بر اساس تعریف ارائه شده توسط USDA خاک شور خاکی است که هدایت الکتریکی عصاره اشباع[1] آن ۴ds/m باشد. این میزان تقریبا معادل ۴۰ میلی‌مولار NaCl بوده و فشار اسمزی معادل ۰,۲ مگاپاسکال ایجاد می‌کند و به طور معنی‌داری سبب کاهش محصولات زراعی خواهد شد [Munns and Tester, 2008].

شوری زیاد یک فاکتور محدودکننده محیطی است که محدوده زیادی از زمین‌های زراعی، رشد، فرایندهای فیزیولوژیکی و متابولیکی گیاه نیز را تحت تاثیر قرار می‌دهد [Zhang et al., 2009]. بیشتر از ۸۰۰ ملیون هکتار از زمین‌ها در سراسر جهان تحت تاثیر شوری قرار دارند. این میزان شامل بیش از ۶ درصد کل زمین‌های موجود است.اغلب این زمین‌ها در نواحی خشک و نیمه خشک قرار دارند. هوازدگی سنگ‌های بستر سبب آزادسازی نمک‌های کلرید سدیم، کلسیم و منیزیم به مقدار بیشتر و سولفات‌ها و کربنات‌ها در مقادیر کمتر می‌شوند که در این بین بیشترین فراوانی مربوط به کلرید سدیم است. عامل دیگر تجمع این نمک‌ها، حمل آنها توسط باد و باران می‌باشد. از ۱۵۰۰ میلیون هکتار از زمین‌های دیم، ۳۲ میلیون هکتار (۲٪) تحت تاثیر شوری ثانویه قرار دارند و از ۲۳۰ میلیون هکتار زمین‌های فاریاب، ۴۵ میلیون هکتار (۲۰٪) آنها تحت شوری هستند[Munns and Tester, 2008].

۱-۳-۱- اثر شوری بر گیاهان و پاسخ به آن

تنش شوری اثر خود را در دو فاز اعمال می‌کند. به عبارت دیگر شوری و حضور نمک بیش از حد در خاک، در طی زمان سبب ایجاد دو تنش اسمزی و یونی در گیاه می‌شود [Munns, 2005] (شکل ۱- پیوست).

[1]- Electrical conductivity

در نخستین فاز یا تنش اسمزی، گیاهان تنش آبی را تجربه می‌کنند. این مرحله با رسیدن غلظت نمک در خاک به حد آستانه خسارت که برای اغلب گیاهان زراعی ۴ ds/m است و به دلیل کاهش شدید پتانسیل آب خاک، در حضور مقادیر بیش از اندازه نمک در آن آغاز می‌گردد و سبب کاهش توسعه برگ و رشد شاخساره خواهد شد [Munns and Tester, 2008]. این حالت مشابه شرایط تنش رطوبتی است اما تفاوت اصلی این دو در این است که برخلاف تنش رطوبتی که مقدار آب در دسترس گیاه محدود است در تنش اسمزی ناشی از شوری، آب به میزان کافی در خاک وجود دارد اما به دلیل پتانسیل پائین‌تر آب خاک نسبت به درون گیاه، ریشه‌ها توانایی جذب آن را ندارند [کافی و همکاران، ۱۳۸۸]. البته به نظر می‌رسد که رشد شاخساره نسبت به رشد ریشه به شوری حساس‌تر باشد. این اتفاق که در خاک‌های خشک هم روی می‌دهد به دلیل تنش اسمزی حاصل از شوری است. این نکته را می‌توان این‌گونه توجیه کرد که کاهش توسعه سطح برگ در مقایسه با ریشه، منجر به مصرف کمتر آب می‌گردد و در نتیجه رطوبت خاک حفظ شده و از افزایش غلظت نمک جلوگیری می‌شود [Munns and Tester, 2008].

پس از جذب نمک و افزایش غلظت آن در برگهای مسن‌تر در بلند مدت، گیاه با دومین فاز اثر شوری یا تنش یونی مواجه خواهد شد که مرگ زودرس برگ مسن و کاهش سطح فتوسنتز را ایجاد می‌کند. چنان‌چه سرعت مرگ این برگ‌ها از سرعت تولید برگ‌های جدید بیشتر باشد، ظرفیت فتوسنتزی گیاه توانایی فراهم کردن کربوهیدرات مورد نیاز برگ‌های جوان را نخواهد داشت که این امر کاهش بیشتر رشد آن ها و همچنین عدم تولید گل و بذر را رقم می‌زند. این کاهش سطح برگ در گیاهان دو لپه با کاهش اندازه تک برگ‌ها یا تعداد شاخه‌های جانبی و در غلات با کاهش تعداد پنجه‌ها رخ می‌دهد [Cramer and Nowak, 1992; Muns, 2005; Munns and Tester, 2008]. هم‌چنین شوری عدم تعادل یونی به ویژه افزایش نسبت Na^+/K^+ و آسیب‌های ثانویه از جمله تنش اکسیداتیو هم ایجاد می‌نماید [Zhu, 2001].

عدم تعادل یونی می‌تواند به دلیل تغییر لیپیدهای غشای پلاسمایی و ترکیب پروتئینی آن در نتیجه تجمع نمک درون گیاه ایجاد شود [Vinocur and Altman 2005; Fujii and Zhu 2009; López-Pérez et al., 2009]. تغییر نسبت یونی Na^+/K^+ در نهایت آنزیم‌ها را غیر فعال و پروتئین‌سازی را مختل می‌کند. در شرایط فیزولوزیکی عادی، گیاه نسبت بالای پتاسیم به سدیم را در سیتوزول سلول‌های خود برقرار می‌کند در حالی‌که شوری این نسبت را تغییر خواهد داد[Tester and Davenport, 2003].

اثرات ثانویه شوری هم که در اثر حضور انواع فعال اکسیژن ایجاد می‌شود سبب تخریب یکپارچگی غشای سلولی و توقف متابولیسم می‌شود [کافی و همکاران، ۱۳۸۸].

مکانیزم‌های تحمل به شوری در سه گروه مجزا دسته‌بندی می‌شوند [Munns and Tester, 2008].

۱) مقاومت به تنش اسمزی: تنش اسمزی سریعا باعث کاهش توسعه سلول در نوک ریشه و برگ‌های جوان و بسته شدن روزنه می‌گردد. پاسخ خفیف به تنش اسمزی منجر به رشد بیشتر برگ و هدایت روزنه‌ای می‌گردد ولی افزایش سطح برگ تنها زمانی موثر خواهد بود که آب کافی در خاک وجود داشته باشد. به عبارت دیگر توسعه بیشتر سطح برگ در صورتی مفید و بارآور است که تامین آب همانند سیستم-های تولیدی فاریاب، تضمین شود. اما در سیستم‌هایی که با کمبود آب مواجه هستند موجب مصرف آب خاک پیش از بلوغ و رسیدگی کامل دانه‌ها و خواهد شد.

۲) دفع یون سدیم از پهنک برگ: دفع سدیم از ریشه‌ها تضمین می‌کند که غلظت این یون در برگ‌ها به حد سمی نرسد. ناتوانی در این امر، بسته به گونه گیاه، سبب آشکار شدن اثرات سمی این یون بعد از چند روز یا چند هفته و مرگ پیش از بلوغ برگ‌های مسن‌تر خواهد شد.

۳)تحمل بافت‌ها [۲]: در این نوع از تحمل به منظور اجتناب از مقادیر سمی یون‌ها در سیتوپلاسم و به ویژه در سلول‌های مزوفیل برگ، تسهیم [۳] یون کلر و سدیم در سطوح سلولی و بین سلولی نیاز است.

۱-۳-۲- اثر شوری بر برنج

برنج در دوران گیاهچه‌ای و دوران زایشی به شوری حساس‌تر است[Flowers and Yeo, 1981; Lutts et al., 1995] . شوری بیش از حد در برنج اثرات متفاوت و وسیع متابولیکی همچون خسارت به دیواره سلولی، پلاسمولیز، لایز سیتوپلاسم، آسیب به غشای آندوپلاسمی، افزایش تجمع سیترات، مالات و و اینوزیتول در پهنک برگ، افزایش دو تا چهار برابری پرولین، کاهش فتوسنتز، کاهش نسبت Fv/ Fm، کاهش میزان جوانه‌زنی و رشد گیاهچه و در نهایت کاهش محصول نهایی را بر جا می‌گذارد [Yeo et al., 1985; Lutts et al., 1995; Garcia et al., 1997; Khan et al., 1997; Pareek et al., 1997; Sivakumar et al., 1998].

اثرات مختلف شوری در برنج، به دلیل تبخیر و تعرق زیاد در دوره کشت آن شدت می‌یابد. از جمله علائم ظاهری خسارت شوری در برنج کاهش رشد گیاه و ریشه آن، پیچیدگی برگ، سفید شدن نوک برگ‌ها، ایجاد لکه‌های سفید در پهنک و خشک شدن برگ‌های مسن‌تر می‌باشد. شوری در آغاز مرحله زایشی نیز باعث عقیمی شدید می‌شود، همچنین زمان گلدهی و رسیدگی با وجود تنش شوری به تاخیر می‌افتد [Ponnamperuma and Bandyopadhya, 1980; Lauchli and Grattan, 2007]. البته لازم به ذکر است که این علائم و آسیب‌ها با توجه به سطح شوری، مدت زمان وجود شوری و مرحله رشدی گیاه در ژنوتیپ‌های مختلف برنج با شدت‌های متفاوتی بروز می‌کنند [Lauchli and Grattan, 2007]. برای مثال در

[2]- Tissue tolerance
[3]- Compartmentalization