

اعتبارسنجی مولکولی ژن‌های پاسخگو به تنش شوری و ارزیابی تنوع آلی آنها در موتانت‌های برنج

مرتضی اولادی قادیلائی^۱، قربانعلی نعمت‌زاده قرا*^۲، غلامعلی رنجبر^۳، سید حمیدرضا هاشمی پطرودی^۴

۱. دانشجوی دکتری اصلاح نباتات دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، پژوهشکده ژنتیک و زیست‌فناوری کشاورزی طبرستان، ساری، ایران.

۲. استاد گروه اصلاح نباتات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، پژوهشکده ژنتیک و زیست‌فناوری کشاورزی طبرستان، ساری، ایران

۳. دانشیار گروه اصلاح نباتات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران

۴. گروه مهندسی ژنتیک و بیولوژی، پژوهشکده ژنتیک و زیست‌فناوری کشاورزی طبرستان، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۴/۱۲ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۷/۱)

Molecular validation of genes responsive to salinity stress and evaluation of their allelic diversity in mutant rice

Morteza Oladi Ghadikolaei¹, Ghorban Ali Nematzadeh Ghara^{2*}, Gholam Ali Ranjbar³, Seyyed Hamidreza Hashemi-petroudi⁴

1. Ph. D. Student of Plant Breeding, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University (SANRU), Genetic and Agricultural Biotechnology Institute of Tabarestan (GABIT), Sari Iran.

2. Professors, Department of Plant Breeding, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University (SANRU), Genetic and Agricultural Biotechnology Institute of Tabarestan (GABIT), Sari, Iran.

3. Associated Professor, Department of Plant Breeding, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University (SANRU), Sari, Iran.

4. Department of Genetic Engineering and Biology, Genetics and Agricultural Biotechnology Institute of Tabarestan (GABIT), Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University (SANRU), Sari, Iran.

(Received: Jul. 1, 2020 - Accepted: Sep. 22, 2020)

Abstract

Marker-assisted selection (MAS), a selective method which is not influenced by environmental factors. The success of MAS-based breeding programs depends on the selection and validation of the markers used. In this study, to validate the gene(s) associated with salinity stress and evaluation of allelic diversity of these markers in mutant rice lines, Band pattern of 18 SSR markers on a leaf sample of 14 mutant lines (M9) of rice, along with 2 susceptible controls (IR29 and Sepidrood) and 2 tolerant controls (Nonabokra and Dylmani) in 1398 in Genetics & Agricultural Biotechnology Institute of Tabarestan (GABIT). 11 primers were selected based on band pattern analysis in susceptible / tolerant cultivars. The molecular analysis results showed that *OsMAPK4*, *OsCML11* and *OsCPK17* had highest polymorphic information content (PIC). *OsMAPK4* and *OsCML11* had highest marker index (MI) at a rate of 0.23. The lowest PIC (0.05) and MI (0.11) was accounted for *OsCAX (D)*. Cluster analysis of molecular data, divided rice genotypes into three distinct groups. However, analysis of Biplot classified the genotypes into four different groups. In this study, 3 genes *OsCML11*, *OsMAPK4* and *OsCPK17* were identified on chromosomes 1, 6 and 7 respectively, as the most efficient primers in identifying the genetic diversity between the rice genotypes, considering that these primers have a very high linkage with salinity resistance genes, can be predicted that 3 lines G1 (M9-P1-7-2-1), G8 (M9-P3-21-1-1) and G9 (M9-P6-7-1-1) have high tolerance to salinity stress.

Keywords: MAS, mutants, Rice, salinity stress.

چکیده

انتخاب به کمک نشانگر (MAS) نوعی گزینش بوده که تحت تأثیر محیط نیست. موفقیت برنامه‌های به‌نژادی بر پایه MAS به انتخاب و اعتبارسنجی آغازگرهای مورد استفاده بستگی دارد. در این تحقیق، جهت اعتبارسنجی ژن (های) مرتبط با تنش شوری و ارزیابی تنوع آلی این آغازگرها در لاین‌های موتانت برنج، الگوی بانندی ۱۸ نشانگر SSR، بر روی نمونه برگی ۱۴ لاین موتانت (M9) برنج، به همراه ۲ شاهد حساس (IR29 و سپیدرود) و ۲ شاهد متحمل (Nonabokra و دیلمانی) در سال ۱۳۹۸ در پژوهشکده ژنتیک و زیست‌فناوری کشاورزی طبرستان بررسی شد. ۱۱ آغازگر بر مبنای تحلیل الگوی بانندی در ارقام حساس / متحمل انتخاب گردیدند. آنالیز مولکولی داده‌ها نشان داد که بیشترین محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC) مربوط به آغازگرهای *OsMAPK4*، *OsCML11* و *OsCPK17* به ترتیب به میزان ۰/۴۶، ۰/۴۶ و ۰/۳۸ بود. بالاترین شاخص نشانگر (MI) مربوط به دو آغازگر *OsMAPK4* و *OsCML11* به میزان ۰/۳۳ بود. آغازگر *OsCAX (D)* دارای کمترین PIC و MI به ترتیب به میزان ۰/۰۵ و ۰/۱۱ بود. لاین‌های موتانت مورد مطالعه توسط تجزیه کلاستر و بای پلات به ترتیب به ۳ و ۴ گروه تقسیم شدند. سه آغازگر *OsCML11*، *OsMAPK4* و *OsCPK17* به ترتیب بر روی کروموزوم‌های ۱، ۶ و ۷ به‌عنوان کاراترین آغازگرها در شناسایی میزان تنوع ژنتیکی بین ژنوتیپ‌های برنج مورد ارزیابی در این مطالعه شناسایی شدند. نظر به اینکه آغازگرهای نامبرده پیوستگی بسیار بالایی با ژن‌های مقاومت به شوری دارند می‌توان پیش‌بینی کرد که لاین‌های G1 (M9-P1-7-2-1)، G8 (M9-P3-21-1-1) و G9 (M9-P6-7-1-1) تحمل بالایی به تنش شوری داشته باشند.

واژه‌های کلیدی: برنج، موتانت، تنش شوری، انتخاب به‌کمک نشانگر.

مقدمه

شوری از جمله عوامل غیر زنده مهم و به عنوان یک مشکل جدی و عامل کندکننده رشد (Kafi, 2008) بوده و تولیدات گیاهی را تحت تأثیر قرار می‌دهد (Munns, 2005). تخمین زده می‌شود که ۲۳ درصد از اراضی تحت کشت دنیا شور (۳۴۰ میلیون هکتار) و ۳۷ درصد (۵۶۰ میلیون هکتار) از این اراضی سدیمی باشند (Tanji, 2012). آسیا بیشترین مساحت اراضی شور را به خود اختصاص داده است (Akbar, 1985). براساس آمار یونسکو، ایران از لحاظ دارا بودن اراضی شور در سطح جهان، مقام پنجم را دارد و برآورد می‌شود که بین ۲۰۰ تا ۳۰۰ هزار هکتار از اراضی برنج‌کاری گیلان، مازندران و گلستان با شوری تهدید می‌شود (Mirdar, 2012). تنش ناشی از خاک شور منجر به کاهش عملکرد برنج می‌گردد (Song et al., 2012). اصلاح موتاسیونی روشی جهت بهبود بسیاری از صفات مهم زراعی، از تحمل به تنش‌های زنده (مانند شوری، سرما، اسیدی...) تا مقاومت به بیماری، کیفیت و بازارپسندی می‌باشد (Okamura et al., 2012). بیشترین وارته‌های موتانت در اصلاح موتاسیونی به روش پرتودهی معرفی گردیدند (Ahloowalia, 2001). بیش از ۲۵۰۰ وارته موتانت در دنیا معرفی شده که از این بین، ۶۴ درصد آن با اشعه گاما اصلاح شده‌اند (Ahloowalia et al., 2004). با بهره‌گیری از روش موتاسیون، می‌توان به لاین‌های موتانت متحمل به شوری نائل شد (Ando, 1970). القای موتاسیون می‌تواند برای افزایش تحمل به شوری در برنج مورد استفاده قرار گیرد (Shereen et al., 2009). Majidi و همکاران (۲۰۱۶) به منظور ارزیابی واکنش لاین‌های موتانت به تنش شوری در مرحله گیاهچه‌ای، بذور برنج رقم طارم محلی را تحت دو تیمار موتازن

شیمیایی اتیل متان سولفونات و تیمار ترکیبی متیل نیتروز اوره همراه با سدیم آزید قرار دادند و در نتیجه دو لاین موتانت برنج فوق‌الذکر به همراه رقم نونابوکرا در گروه متحمل قرار گرفتند.

پاسخ گیاهان به تنش شوری همواره یکی از موضوعات مهم مطالعات فیزیولوژیکی، مولکولی، بیوشیمیایی، مهندسی ژنتیک و اصلاح نباتات بوده است (Kawaura et al., 2008). ملزومات اساسی در برنامه‌های اصلاحی به کمک آغازگرهای مولکولی^۱ MAS: ۱- پیوستگی بسیار نزدیک آغازگرها با صفت مورد نظر (یک سانتی‌مورگان یا کمتر) (Mohan et al., 1997)، ۲- استفاده از تکنولوژی PCR در غربالگری جمعیت بزرگ، ۳- تکنیک‌های مورد استفاده باید آسان و به صرفه بوده و قابلیت تکرارپذیری داشته باشند (Mohan et al., 1997). کارایی تکنولوژی MAS در مقایسه با سایر تکنولوژی‌ها از جمله روش اصلاح سنتی: ۱- توانایی ارزیابی در مرحله گیاهچه‌ای برای صفاتی که در مرحله بلوغ ظاهر می‌شوند (مثل کیفیت میوه و بذور، نرعقیمی و حساسیت به دوره نوری)، ۲- توانایی بررسی صفاتی که ارزیابی آنها مشکل و گران بوده و برای امتیازبندی فنوتیپی هزینه بر هستند (مثل مورفولوژی ریشه، مقاومت به آفات قرنطینه شده یا سوبه‌ها و بیوتایپ‌های بیماری و تحمل استرس‌هایی مثل خشکی، شوری و مواد سمی و ...)، ۳- توانایی تشخیص هموزیگوت‌ها و هتروزیگوت‌ها در بسیاری از لوکوس‌ها در یک نسل بدون احتیاج به آزمون نتاج (چون آغازگرهای مولکولی همباززند) و ۴- قابلیت انجام همزمان انتخاب به کمک آغازگر برای چندین صفت (Gonzalez et al., 2006).

تحمل به شوری از جمله ویژگی‌های ژنتیکی

1. Marker Assisted Selection

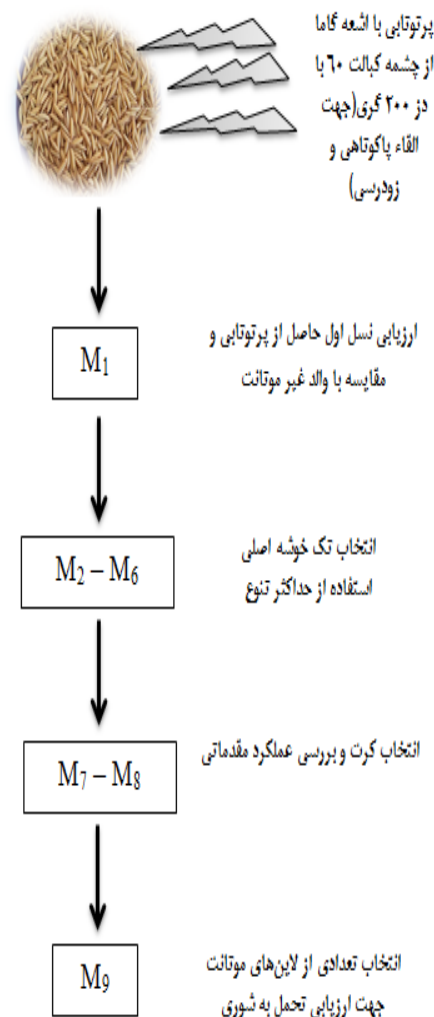
مجموعه آغازگر را با ۱۷ ژنوتیپ متحمل و ۱۷ ژنوتیپ حساس برنج مورد بررسی قرار دادند که در نهایت، ۱۸ آغازگر دارای پلی مورفیسم با میانگین ۲۱/۸ آلل برای هر پرایمر و با PIC ۰/۲۸ معرفی شدند (Kutubuddin *et al.*, 2015). در چندین مطالعه ژن‌های MAP کیناز برای تحمل به شوری برنج مورد مطالعه قرار گرفتند که در نهایت ثابت شد، ژن‌های *OsMAPK4* (Fu *et al.*, 2002)، *OsMAPK5* (Xiong & Yang, 2003)، *OsMAPK44* (Jeong *et al.*, 2006)، *OsMSRMK2* (Agrawal *et al.*, 2002) و *OsMSRMK3* (Agrawal *et al.*, 2003) و *OsEDR1* (Kim *et al.*, 2003) در پاسخ به تنش شوری بسیار مؤثر هستند. ژن *OsMSRMK2* در تنظیم رونویسی و مسیر دفاعی تنش شوری در برنج نقش مهمی دارد (Agrawal *et al.*, 2002). ژن *OsMAPK4* نه تنها در مرحله رشدی گیاه برنج تأثیر دارد بلکه در مسیر سیگنالینگ تحمل به تنش شوری نقش خوبی را ایفا می‌کند (Fu *et al.*, 2002). از ژن‌های متحمل به شوری می‌توان به *OsNAC5* و *OsNAC6* اشاره نمود که با بیان بالای این دو ژن، تحمل شوری و خشکی در گیاه در مرحله گیاهچه‌ای افزایش می‌یابد (Nakashima *et al.*, 2007; Takasaki *et al.*, 2010; Jeong *et al.*, 2013).

لاین‌های موتانت (M9) برنج مورد مطالعه در این تحقیق حاصل از پرتوتابی اشعه گاما از چشمه کبالت ۶۰ با دز ۲۰۰ گری در سال ۱۳۸۹ جهت القا صفات پاکوتاهی و زودرسی روی برخی ارقام نظیر سنگ‌طارم، رشتی، هاشمی، چالوسی، دمسیاه، نعمت و خزر بوده که در قالب یک پروژه تحقیقاتی توسط محققین پژوهشکده ژنتیک و زیست‌فناوری کشاورزی طبرستان و با همکاری پژوهشکده کشاورزی هسته‌ای در حال انجام می‌باشد. ارزیابی مقدماتی ۲۷۵ لاین موتانت (نسل M7) توسط

پیچیده است که توسط تعداد زیادی از ژن‌ها کنترل می‌گردد (Pervaiz *et al.*, 2003; Das & Parida, 2004). نخستین ارزیابی‌ها جهت تحمل به تنش شوری در برنج از سال ۱۹۷۵ در موسسه تحقیقات بین‌المللی برنج (IRRI) آغاز گردید. در ادامه و در نتیجه تحقیقات انجام شده در هند موجب شد نخستین رقم برنج پرمحصول متحمل به شوری در سال ۱۹۸۹ با نام CSR10 معرفی شود (Mishra *et al.*, 2004). همچنین واریته‌های برنج متحمل به شوری CSR27 و CSR30 نیز معرفی گردیدند (Singh & Sharma, 2006). تعداد زیادی جایگاه ژن‌های کنترل‌کننده خصوصیات کمی (QTLs) که در تحمل به شوری برنج نقش دارند، توسط محققان مختلف جهت انتخاب به کمک آغازگرهای مولکولی (MAS) معرفی شدند که می‌توان به *Salt*، *SCK1RSS1* و *saltol* اشاره نمود (Munes, Ren & Garcia *et al.*, 1998; 2005). Ren و همکاران (2005) با استفاده از جمعیت‌های حاصل از تلاقی رقم Nona Bokra (متحمل) و رقم Koshihikari (حساس) توانستند، ژن *OsHKT1;5* را شناسایی و به عنوان QTL متحمل به شوری معرفی نمایند (Ren *et al.*, 2005). Kutubuddin و همکاران (2005) با شناسایی و آنالیز ژن‌های جدید مرتبط با شوری بر اساس آغازگر SSRs در برنج، ۲۲۰ ژن دخیل در تحمل به شوری را گزارش نموده و از بین آنها برای ۱۰۶ ژن، ۱۸۰ مکان ریز ماهواره با موتیف‌های سه نوکلئوتیدی (۳۷ درصد)، دو نوکلئوتیدی (۲۶ درصد) و تترانوکلئوتیدی شناسایی نمودند. همچنین اظهار نمودند که ۳۷ درصد این موتیف‌ها در منطقه توالی‌های کدکننده، ۲۶ درصد در 5'UTR، ۲۱ درصد در اینترون و ۱۵ درصد در منطقه 3'UTR قرار دارند. در ادامه جهت اعتبارسنجی نتایج، ۱۹

Norollahi و همکاران (۲۰۱۸) جهت شناسایی لاین‌های متحمل به شوری تحت تنش شوری NaCl در سطح شوری ۶ دسی زیمنس بصورت گلدانی انجام شد که در تحقیقات اولیه، ۱۴ لاین موتانت به‌عنوان لاین‌های متحمل به شوری شناسایی و جهت مطالعات مولکولی در این تحقیق از آن‌ها استفاده گردید (نمودار ۱).

بذور سنگ‌خارم، رشتی، هاشمی، چالوسی، دمسیاه، خزر، نعمت



نمودار ۱. روش اصلاح موتاسیونی لاین‌های موتانت مورد مطالعه در این تحقیق

Figure 1. Method of mutation breeding of mutant lines studied in this research

هدف از مطالعه حاضر، (۱) اعتبارسنجی ژن‌های پاسخگو به تنش شوری در ارقام حساس و متحمل، (۲) ارزیابی تنوع آلی آغازگرهای کاندید در لاین‌های موتانت و ارقام شاهد، (۳) شناسایی لاین‌های موتانت (M9) محتمل به تنش شوری به روش MAS.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق جهت اعتبارسنجی ژن‌ها و ارزیابی تنوع آلی، نمونه‌های برگی ۱۴ لاین موتانت (M9) برنج به همراه ۲ شاهد داخلی حساس (سپیدرود) و دیلمانی (متحمل) و ۲ شاهد بین‌المللی حساس (IR29) و متحمل (نونابوکرا) تهیه شده از بانک بذر برنج پژوهشکده ژنتیک و زیست فناوری کشاورزی طبرستان) در سال ۱۳۹۸ از مزرعه پژوهشکده برداشت شد. نشانگرهای SSR مرتبط با تنش شوری با توجه به تحقیق کوتوبودین و همکاران (۲۰۱۵) انتخاب و سنتز (Metabion, Germany) گردید (جدول ۱). لاین‌های موتانت مورد مطالعه در این تحقیق در شرایط نرمال نیز با فاصله ۲۵ * ۲۵ بصورت تک بوته در مزرعه پژوهشکده در سال ۱۳۹۸ کشت و برخی صفات مهم زراعی نظیر ارتفاع بوته (سانتی-متر)، تعداد پنجه، طول خوشه (سانتی‌متر)، ۵۰٪ گلدهی به همراه عملکرد (متر مربع) یادداشت‌برداری شدند (جدول ۲).

استخراج DNA با استفاده از روش CTAB (Doyle J, 1987)، محاسبه غلظت DNA با استفاده از میزان جذب UV با دستگاه اسپکتروفتومتری (Beckman coulter, USA,) با طول موج ۲۶۰ تا ۲۸۰ نانومتر و در ادامه تعیین کمیت و کیفیت DNA ژنومی با روش الکتروفورز ژل آگارز و جهت تکثیر DNA از دستگاه PCR (مدل Bio-Rad) استفاده شد.

۳۲ چرخه شامل یک دقیقه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد، ۵۰ ثانیه در دمای ۵۷ درجه سانتی‌گراد و ۵۵ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد و در نهایت مرحله سوم با ۷ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد، پایان یافت. محصول PCR بر روی ژل آگارز ۲/۵ درصد در ولتاژ ۶۰ ولت الکتروفورز و پس از رنگ‌آمیزی با محلول اتیدیوم بروماید در زیر نور ماوراء بنفش مشاهده شد.

واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR)

غلظت نهایی مخلوط واکنش برای آغازگر SSR (جهت یک واکنش ۱۲ μl) حاوی ۴/۴ μl آب دوبار تقطیر (ddH₂O)، ۶ μl MasterMix، ۰/۶ μl DNA (۱ μl) الگو بوده است. واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز برای هر ترکیب آغازگری شامل مراحل زیر بوده است: مرحله اول به مدت ۴ دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، مرحله دوم در

جدول ۱. ۱۸ نشانگر SSR متحمل به تنش شوری در برنج مورد استفاده در این تحقیق (Kutubuddin و همکاران، ۲۰۱۵)

Table 1. 18 SSR markers of salinity tolerance in rice used in this study (Kutubuddin et al., 2015)

نام ژن Gene name	توالی آغازگر Primer sequence	دمای ذوب Tm (°C)	طول قطعه تکثیر شده Amplicon size (bp)	مکان کروموزوم Chromosome Position
OsNac5	F ATGTGATTAGAGTCGCTTTCAGTTGG	56.9	238	11
	R CCAGCTTGTACTTGTGCCAGCC	58.4		
OsCML8	F GAGAATCAGAGCAAGAGTCTGAACCAGC	61	209	10
	R GTCAGCCGCTTCTTCCTCACCTG	61		
OsCML11	F CATGCAAGCCTGCGGAGACG	61.2	154	1
	R CGGTGCAAGGAGCGGAAGATCT	60.5		
OsGMST1	F AGGAACCAAAGAAGCAAAGGTG	56.3	194	2
	R GAGGTGATTTGATGCTGTGAGGC	57.4		
OsCPK17	F TTGCCTTTTGTATCTAGTGCATTGG	57.2	267	7
	R GTCTTCGTCCTTACTAAATAGCACTCC	55.8		
OsCAX (D)	F CTGTTTGGCAATCTGCCAGC	55.6	139	2
	R CGTCTCGGCAAAATGTTCTC	56.1		
OsCAX (T)	F CTTTGGTTGGTTCAGGACGATG	55.9	163	2
	R GAATTGGAAGCTGTTGGCTCATTC	57.9		
OsC3H50	F GAGGAATTAGACCATTTAACTCGTCGC	58.7	214	7
	R GAATCCGACCCAATCCAATCAAG	58.3		
OsMAPK4	F GACATCTAAGTGCCGCGTGTTT	56.2	254	6
	R TACATGCAGCGTCAATCGAAG	57.6		
OsWRKY13	F CCATGCGTACATACACGTTTCATGTG	57	246	1
	R GATGGGTGCAGCTTTCAATGATC	57.3		
OsCA1	F CCATCGAGTACGCCGCTGTC	57.9	281	1
	R CTTACCATGAATGTTACACAACCCTAC	56.8		
OsRacB(D)	F GTCCTGGTTCAACCTTCTTCTTTC	57.1	176	2
	R GTGACGCACTTATGAACCTGGAC	56.5		
OsRacB(T)	F CAAGACCTGCATGCTCATCT	56.1	202	2
	R CCAGATCAAGAACCATAATCCTAGCTC	56.9		
OsUGE1	F CACAACGCCAACCTCGAC	57.7	154	5
	R GCTTATCGAGATGGGAATGGTTG	56.5		
OsMSRMK3	F CACCTCCATTTCCCATCCACC	58.9	201	6
	R CGAATCGAAGGCGGCAGCTATAG	60.9		
OsCLC-1	F CAGAGAAGCCAAGCAAAGAAAGTCTC	58.1	179	2

	R	CCGTGCTCTCGATGTCGTTG	59.2		
OsZIP71	F	CTCAGTAAGCTCCCTGTAGTTGTAGCC	57.3	259	9
	R	GTTTCAGGTCATCTTCCGACCTGG	58.5		
OsPEX11-1	F	GCTGCTCTCGACTTCTTGTCC	56.2	276	3
	R	ACTAGCCCTGCACAGACTGAAGAG	55.8		

جدول ۲. مشخصات زراعی لاین‌های موتانت به همراه شاهد‌های حساس و متحمل به شوری برنج در شرایط نرمال
Table 2. Morphological characteristics of mutant lines along with salt tolerant and sensitive genotypes in rice under normal conditions

ژنوتیپ Genotype	کد لاین Line ID	ارتفاع بوته Plant Height (cm)	تعداد پنجه بارور No. Fertile tiller	طول خوشه Panice length (cm)	روز از نشاکاری تا رسیدگی No. Day to maturity	عملکرد Grain yield (m ²)
G1	M ₉ -P ₁ -7-2-1	141 ± 0.78	13 ± 0.58	25 ± 1.15	85 ± 1.15	386.72 ± 12.24
G2	M ₉ -P ₂ -1-3-1	125 ± 1.15	11 ± 0.58	26 ± 0.58	95 ± 0.58	390.24 ± 14.43
G3	M ₉ -P ₃ -4-5-1	114 ± 0.87	13 ± 1.15	28 ± 0.58	88 ± 2.31	427.84 ± 4.28
G4	M ₉ -P ₃ -4-5-3	115 ± 1.59	12 ± 0.58	23 ± 1.15	87 ± 1.73	372.96 ± 7.07
G5	M ₉ -P ₃ -4-7-1	112 ± 1.37	13 ± 0.58	29 ± 0.58	89 ± 1.15	445.44 ± 6.30
G6	M ₉ -P ₃ -4-7-2	112 ± 1.15	14 ± 0.58	24 ± 1.73	92 ± 1.15	532.64 ± 5.61
G7	M ₉ -P ₃ -4-7-3	117 ± 0.58	12 ± 1.15	25 ± 1.7	90 ± 0.58	398.72 ± 1.45
G8	M ₉ -P ₃ -21-1-1	134 ± 0.87	16 ± 0.58	26 ± 1.73	92 ± 0.58	440.48 ± 12.62
G9	M ₉ -P ₆ -7-1-1	137 ± 0.17	17 ± 0.58	26 ± 0.58	91 ± 1.15	432.96 ± 16.34
G10	M ₉ -P ₆ -13-2-1	114 ± 1.15	15 ± 1.12	28 ± 1.15	91 ± 1.73	405.44 ± 10.80
G11	M ₉ -P ₈ -7-2-1-10-1	138 ± 0.9	14 ± 1.73	28 ± 0.58	98 ± 1.15	295.04 ± 5.90
G12	M ₉ -P ₁₀ -5-4-6-1	130 ± 1.15	16 ± 1.73	25 ± 1.73	95 ± 1.73	544.8 ± 6.63
G13	M ₉ -P ₁₀ -5-4-6-2	123 ± 0.73	14 ± 1.15	28 ± 0.58	93 ± 1.73	475.52 ± 6.24
G14	M ₉ -P ₁₈ -7-2-1	109 ± 1.15	16 ± 1.17	25 ± 1.15	91 ± 0.58	404.16 ± 7.73
G15	IR29	97 ± 0.51	16 ± 0.58	27 ± 0.58	99 ± 1.15	300.32 ± 5.15
G16	Sepidrood (سپیدرود)	109 ± 0.58	17 ± 1.73	27 ± 1.15	96 ± 1.15	520.64 ± 9.13
G17	Dylamani (دیلمانی)	158 ± 0.54	11 ± 0.58	28 ± 0.58	93 ± 1.73	413.76 ± 6.62
G18	Nonabokra	105 ± 1.15	17 ± 1.15	29 ± 1.15	101 ± 0.58	313.28 ± 6.92

G1-18: ژنوتیپ ۱ الی ۱۸، M₉: نسل نهم موتانت، P₁: سنگ طارم، P₂: طارم رشتی، P₃: طارم هاشمی، P₆: طارم چالوسی، P₈: دمسیاه، P₁₀: نعمت و P₁₈: خزر.
G1-18: Genotype 1-18, M₉: Eight generation mutant, P₁: Sang e tarom, P₂: Tarom rashti, P₃: Tarom Hashemi, P₆: Tarom chaloci, P₈: Domsiyah, P₁₀: Nemat, P₁₈: Khazar.

نرم‌افزار NTSISver.2.2 استفاده شد. سپس با استفاده از نرم افزار GeneAlex، محتوای اطلاعات چندشکلی^۱ (PIC)، فاصله ژنی نی (Nie)، شاخص اطلاعات شانون (I) و شاخص نشانگر (MI)، از طریق فرمول‌های زیر محاسبه شد (Anderson et al., 1993).

$$\text{رابطه ۱) محتوای چند شکلی (PIC)} \\ \text{PIC} = 1 - \sum_{ij} P_{ij}^2$$

$$\text{رابطه ۲) ضریب شانون (I)} \\ I = -\sum (P_i * \ln P_i)$$

$$\text{رابطه ۳) فاصله ژنی نی (Nei 1978)}$$

جهت واردنمودن ماتریس داده‌ها در نرم‌افزار NTSISver.2.2 نمره‌دهی باندها بر اساس صفر و یک بوده است. با توجه به دو آلی بودن آغازگر SSR در نمره‌دهی، ردیف آلی اول که در مقایسه با شاهد متحمل دارای باند بوده (وجود باند) عدد یک و در صورت عدم وجود باند عدد صفر و همچنین برای ردیف آلی دوم که در مقایسه با شاهد حساس دارای باند بوده (وجود باند) عدد یک و در صورت عدم وجود باند عدد صفر منظور می‌گردد و بالطبع برای ستون آلی (که هتروزیگوت بوده و برای هر دو ردیف آلی متحمل و حساس باند داشته) عدد یک و یک لحاظ شد. جهت تجزیه کلاستر و نیز نمودار بای‌پلات (دوبعدی) از

1. Polymorphic information contents
2. Marker index

الگوی بانندی آغازگرهای SSR

به منظور ارزیابی اولیه آغازگرها، ۱۸ نشانگر SSR در ارقام شاهد حساس و متحمل بررسی شد. به طوری که هر کدام از آغازگرهایی که بین زنوتیپ‌های شاهد متحمل و حساس الگوی بانندی متفاوتی نشان دادند، انتخاب گردیدند. نمونه‌ای از پروفایل ژل آگارز مربوط به آغازگرهای مرتبط به تنش شوری به همراه ارقام شاهد ارائه شده است (شکل ۱).

(500bp)

(200bp)

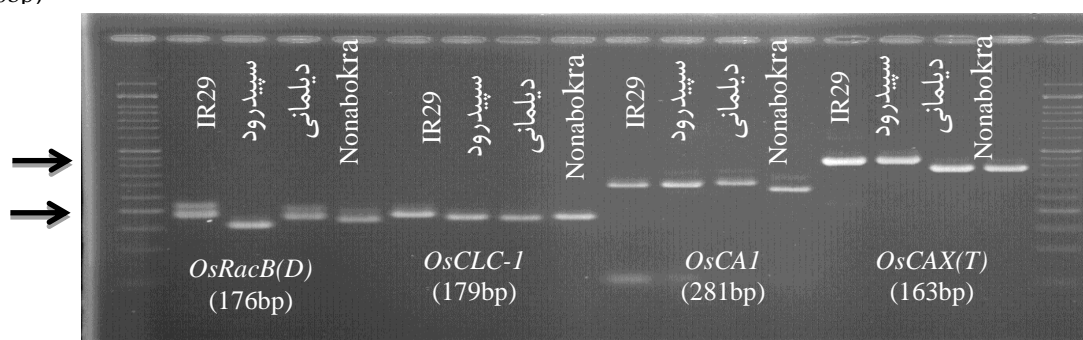
$$H=1-\frac{N_{x,y}}{N_x+N_y}$$

رابطه (۴) شاخص نشانگر (MI)

$$MI = PIC \times EMR$$

$$EMR = np (np/n)$$

نتایج و بحث



شکل ۱. پروفایل ژل آگارز مربوط به ۴ آغازگر مرتبط به تنش شوری به همراه ارقام شاهد

Figure 1. Profile agarose gel of 4 primers related to salinity stress together with controls

شاهد حساس (G15) و متحمل (G16) (اولویت انتخاب شاهد بین‌المللی) پس از بهینه‌سازی شرایط PCR، تهیه شد.

در جدول ۳ بیش‌ترین محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC) مربوط به آغازگرهای *OsCPK17* و *OsCML11*، *OsMAPK4* به ترتیب به میزان ۰/۴۶، ۰/۴۶ و ۰/۳۸ بود همچنین دو آغازگر *OsCML11* و *OsMAPK4* بالاترین شاخص نشانگر (MI) را نیز به میزان ۰/۲۳ به خود اختصاص دادند. پرایمر *OsCAX(D)* دارای کمترین PIC و MI به ترتیب با میزان ۰/۰۵ و ۰/۱۱ بود. شاخص PIC برای تعیین قدرت تفکیک آغازگرها به کار می‌رود که نه تنها به تعداد آلل‌ها در هر جایگاه، بلکه به تعداد فراوانی نسبی هر آلل نیز بستگی دارد (Sorkheh et al., 2007). Qi و همکاران (۲۰۰۶) گزارش دادند آغازگرهایی که PIC بزرگتر از ۰/۵

در آغازگر *OsCAX(T)* باند مشاهده شده (۱۶۳ bp) از باند مورد انتظار (۱۶۳ bp) از طول بیشتری برخوردار بود هر چند که ارقام حساس و متحمل بدرستی متمایز شد ولی اندازه بانندی آن در بین لاین‌های ایرانی متفاوت بود. همچنین ۶ آغازگر *OsWRKY13*، *OsC3H50*، *OsGMST1*، *OsZIP71*، *OsUGE1*، *OsRacB(T)* نیز قادر به متمایز ساختن ارقام شاهد متحمل و حساس به شوری نبودند و بر همین اساس از ادامه ارزیابی مولکولی حذف شدند و در نهایت ۱۱ آغازگر به نام‌های *OsCML11*، *OsCML8*، *OsNac5*، *OsCPK17*، *OsCAX(D)*، *OsMAPK4*، *OsCA1*، *OsMSRMK3*، *OsRacB(T)*، *OsPEX11-1*، *OsCLC-1* در ارزیابی اولیه مولکولی انتخاب شدند. در ادامه الگوی نواری هر یک از این آغازگرها به همراه ۱۴ لاین موتانت و ۲

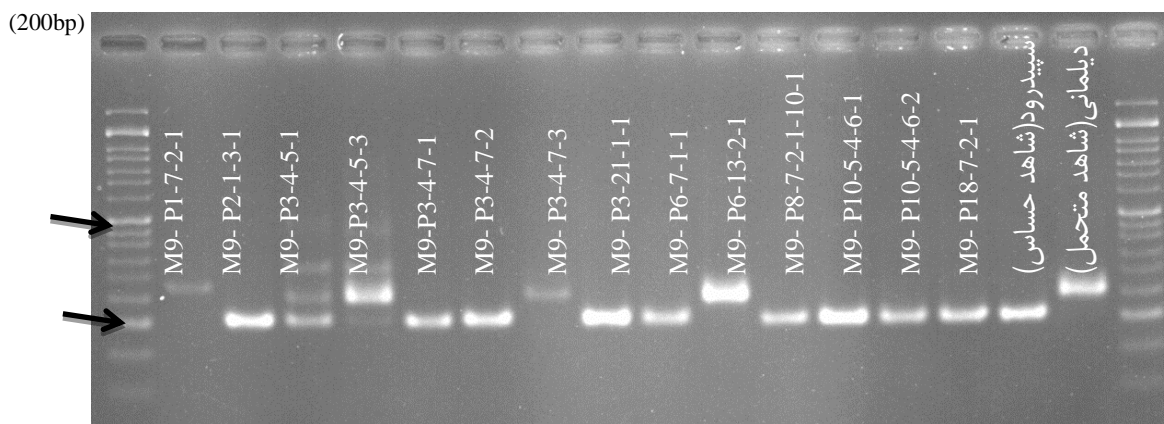
با بررسی تنوع آلی ژن‌های پاسخگو در تحمل به تنش شوری و محتوای اطلاعات چندشکلی، تعداد آل مؤثر و شاخص نشانگر در جدول ۳ تعداد سه آغازگر به نام‌های *OsMAPK4*، *OsCML11* و *OsCPK17* که دارای بیشترین PIC و شاخص نشانگر MI بودند انتخاب شدند. الگوی بانندی ژن *OsCPK17*(267bp) به همراه ۱۴ لاین موتانت مورد مطالعه و دو شاهد حساس و متحمل در شکل ۲ نشان داده شده است.

داشته باشند، دارای اطلاعات سودمند زیادی هستند و آغازگرهایی که مقادیر PIC آنها بین ۰/۲۵ و ۰/۵ باشد سودمند هستند و همچنین آغازگرهایی که دارای مقادیر PIC کمتر از ۰/۲۵ باشد، حاوی اطلاعات سودمند کمتری هستند. تاکنون مقادیر مختلفی برای چندشکلی و شاخص چندشکلی گزارش شده است. به‌عنوان مثال با میانگین ۷/۳ (Abdollahi & Aziz, 2014)، (از ۰/۰۷ تا ۰/۸) و با میانگین ۰/۵۶ (Maccaferri et al., 2007)، با میانگین ۰/۳ (Bohn et al., 1999) گزارش داده‌اند.

جدول ۳. محتوای اطلاعات چندشکلی، تعداد آل مؤثر و شاخص نشانگر در لاین‌های موتانت برنج
Table 3. Polymorphism information content (PIC), number of observed and effective alleles and marker index in Mutant rice lines

Gene	Band Freq.	Na ¹	Ne ²	I ³	He ⁴	uHe ⁵	PIC ⁶	MI ⁷
ژن	فراوانی آل	تعداد آل	آل مؤثر	ضریب شانون	هتروزایگوسیتی مورد انتظار	هتروزایگوسیتی مشاهده شده	محتوای اطلاعات چندشکلی	شاخص آغازگر
<i>OsMAPK4</i>	0.50	2	1.69	0.59	0.40	0.41	0.46	0.23
<i>OsPEX11-1</i>	0.59	2	1.85	0.65	0.46	0.47	0.29	0.17
<i>OsCML8</i>	0.59	2	1.85	0.65	0.46	0.47	0.29	0.17
<i>OsMSRMK3</i>	0.50	2	1.65	0.54	0.36	0.37	0.37	0.18
<i>OsNac5</i>	0.53	2	1.63	0.53	0.36	0.37	0.27	0.14
<i>OsCAX(D)</i>	0.50	2	1.33	0.35	0.21	0.22	0.11	0.05
<i>OsCPK17</i>	0.53	2	1.73	0.59	0.41	0.42	0.38	0.20
<i>OsCML11</i>	0.50	2	1.69	0.59	0.40	0.41	0.46	0.23
<i>OsRacB(T)</i>	0.65	2	1.83	0.64	0.45	0.46	0.08	0.05
<i>OsCLC-1</i>	0.56	2	1.78	0.62	0.43	0.44	0.33	0.18
<i>OsCA1</i>	0.56	2	1.81	0.64	0.44	0.46	0.36	0.20

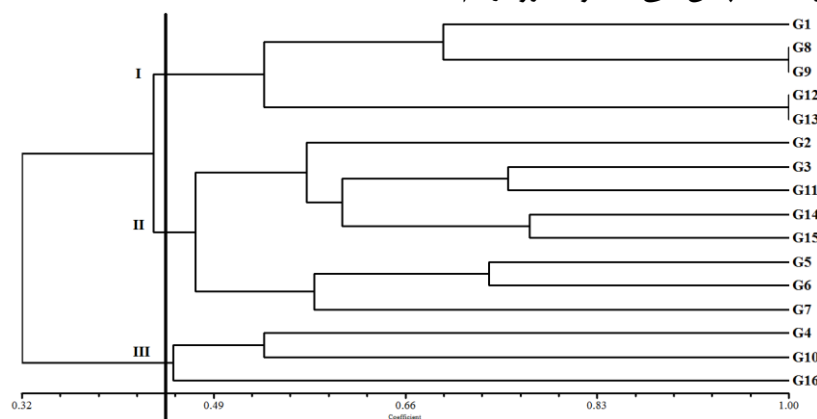
(500bp) Number of different alleles, 2- Number of effective alleles, 3- Shannon's information index, 4- Expected heterozygosity, 5- Unbiased Expected Heterozygosity, 6- Polymorphic information contents, 7- Marker index.



شکل ۲. الگوی بانندی ژن *OsCPK17*(267bp) مربوط به ۱۴ لاین موتانت به همراه ارقام شاهد
Figure 2. Band gene pattern *OsCPK17* (267bp) for 14 mutant lines together with control

متحمل باشند. Hosseini و همکاران (۲۰۱۸)، ۴۱ لاین موتانت برنج حاصل از پرتوتابی اشعه گاما را با استفاده از ۱۲ آغازگر ریزماهواره پیوسته با QTL بزرگ اثر تحمل به شوری (*SalTol*) تحت تنش شوری ۶ و ۱۲ دسی‌زیمنس مورد ارزیابی قرار دادند. تجزیه خوشه‌ای بر اساس ضریب تشابه جاکارد و روش UPGMA، ژنوتیپ‌ها را در سه گروه قرار داد و سه لاین موتانت M37، M35 و M40 به همراه شاهد FL478 را به‌عنوان ژنوتیپ‌های متحمل به شوری شناسایی نمودند (Hosseini et al., 2018).

تجزیه کلاستر داده‌های مولکولی با استفاده از ضریب تشابه جاکارد و بر اساس الگوریتم UPGMA صورت گرفت. همچنین خط برش بر اساس نظر محقق و با توجه به فرارگیری ارقام شاهد حساس و متحمل در کلاستر اعمال گردید. نتایج حاصل از تجزیه کلاستر با میزان تشابه حدود ۰/۴۲ لاین‌های موتانت مورد مطالعه را به ۳ گروه تقسیم نمود (شکل ۳). در این کلاستر ۵ لاین در گروه اول، ۷ لاین به همراه ژنوتیپ شاهد حساس (G15) در گروه دوم و ۲ لاین G4 از موتانت هاشمی و G10 از موتانت چالوسی به همراه ژنوتیپ شاهد متحمل (G16) در گروه سوم قرار گرفتند که پیش‌بینی می‌شود جزو ارقام



شکل ۳. تجزیه کلاستر حاصل از داده‌های مولکولی بر اساس الگوریتم UPGMA با استفاده از ضریب تشابه جاکارد
Figure 3. Cluster analysis of molecular data based on UPGMA algorithm using jacquard similarity coefficient

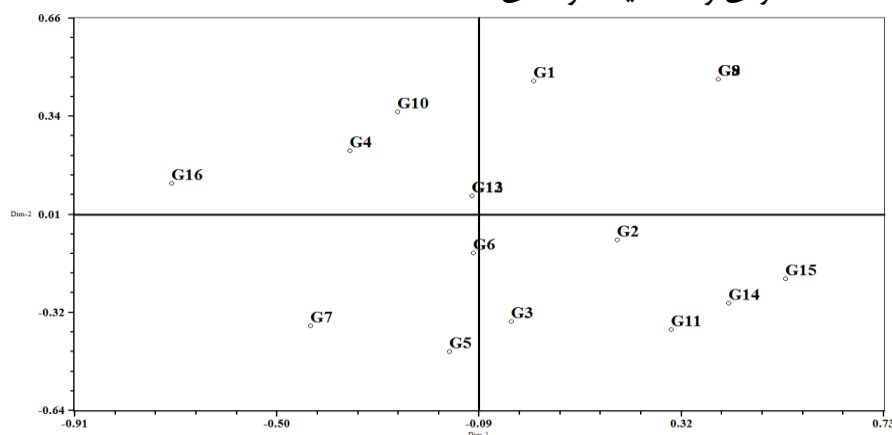
دادند. مقایسه نتایج بای‌پلات و کلاستر نشان داد که لاین‌های گروه اول و دوم تجزیه بای‌پلات در گروه دوم از تجزیه کلاستر (شامل دو زیر گروه) به همراه شاهد حساس (G15) قرار گرفتند، لاین‌های گروه سوم تجزیه بای‌پلات نیز مشابه با لاین‌های گروه سوم از تجزیه کلاستر به همراه شاهد متحمل (G16) بودند، با این تفاوت که دو لاین G12 و G13 در تجزیه بای‌پلات با توجه به نزدیکی به خط عمود، در گروه اول (زیر گروه ۲) تجزیه کلاستر جای

تجزیه بای‌پلات (شکل ۴) لاین‌های مورد مطالعه را به ۴ گروه تقسیم نمود، به‌طوری‌که گروه اول تعداد ۳ لاین به‌عنوان گروه خیلی حساس، گروه دوم شامل ۴ لاین به همراه G15 (شاهد حساس) به‌عنوان گروه حساس، گروه سوم ۴ لاین G4، G10، G12 و G13 به همراه G16 (شاهد متحمل) به‌عنوان گروه متحمل و گروه چهارم ۳ لاین G1، G8 و G9 به‌عنوان لاین‌هایی با تحمل بالای شوری شناسایی شدند. در این شکل دو لاین G12 و G13 و همچنین G8 و G9 کاملاً بر هم منطبق بوده و رفتاری شبیه هم نشان

استراتژیک همچون برنج، گندم، ذرت و غیره به شوری آب و خاک، ضرورت به‌نژادی و دستکاری ژنتیکی جهت ایجاد گونه‌های زراعی توانمند بیشتر احساس می‌شود بنابراین اصلاح واریته‌هایی با تحمل بالا در مقابل شوری بایستی مورد توجه قرار گیرد (Singh, 2001). اصلاح گیاهان زراعی برای بهبود و توسعه ارقام جدید متحمل به تنش‌های مختلف نیازمند تنوع ژنتیکی است که به دلیل شدت کارهای اصلاحی در سطح گونه‌های گیاهی، تنوع به سطح پایینی رسیده، لذا می‌توان از موتاسیون به‌عنوان فرایند افزایش تنوع ژنتیکی استفاده گردد (Yilmaz & Boydak, 2006).

گرفتند و در نهایت لاین‌های گروه چهارم تجزیه بای پلات در گروه اول (زیر گروه ۱) حاصل از تجزیه کلاستر قرار گرفتند. بنابراین می‌توان اظهار نمود که تجزیه بای پلات تا حدود زیادی نتایج تجزیه کلاستر را تأیید نمود. نتایج مطالعات Jahani و همکاران (۲۰۱۶) روی تنوع ژنتیکی ۹۵ ژنوتیپ بین‌المللی برنج به کمک ۶۷ آغازگر ریزوماهواره SSR نشان داد که ژنوتیپ‌ها با استفاده از تجزیه خوشه‌ای و تجزیه بای پلات، به ۴ گروه تقسیم شدند. نتایج تجزیه به مختصات اصلی تأییدکننده نتایج تجزیه خوشه‌ای بود، به‌نحوی که توانست با دو مختصات اول، مقدار ۷۱/۱۵ درصد از تغییرات کل را توجیه نماید (Jahani et al., 2016).

با توجه به ضعف عملکردی و حساسیت گونه‌های



شکل ۴. نمودار دوبعدی یا بای پلات مربوط به پراکنش لاین‌های مورد مطالعه به همراه ارقام شاهد

Figure 4. Bi-plot diagram related to the distribution of the studied lines together with control

(Ribaut & Hoisington, 1998). با مطالعات صورت گرفته در این تحقیق ۳ آغازگر *OsCPK17* و *OsMAPK4*، *OsCML11* به‌ترتیب بر روی کروموزوم‌های ۱، ۶ و ۷ با توجه به شاخص نشانگر و محتوای چندشکلی به‌عنوان کارآترین آغازگرها در شناسایی میزان تنوع ژنتیکی بین ژنوتیپ‌های برنج مورد ارزیابی در این مطالعه شناسایی شدند. نظر به این که آغازگرهای نامبرده

تکنیک MAS، اصلاح گیاه بواسطه انتخاب به کمک آغازگر است که با کمک توالی یا الگوی بانندی حاصل از آغازگرهای مولکولی که در اطراف ژن مورد نظر قرار گرفته‌اند می‌توان به‌طور غیر-مستقیم حضور یا عدم حضور صفت مورد نظر را بررسی نمود. انتخاب فقط بر مبنای اطلاعات حاصل از آغازگر (Pure MAS) و یا از مجموع داده‌های فنوتیپی و آغازگر (Combined MAS) می‌باشد

از پژوهشکده ژنتیک و زیست‌فناوری کشاورزی طبرستان، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری به خاطر تأمین مالی و در اختیار قرار دادن امکانات آزمایشگاهی و زمین تحقیقاتی برنج، همچنین از کارشناسان بخش فنی- تحقیقاتی برنج پژوهشکده، تشکر و قدردانی می‌شود.

پیوستگی بسیار بالایی با ژن‌های مقاومت به شوری دارند، می‌توان پیش‌بینی نمود لاین‌های G1 (M₉-P₁-7-2-1) از موتانت سنگ‌طارم، G8 (M₉-P₃-21-1-1) از موتانت هاشمی و G9 (M₉-P₆-7-1-1) از موتانت چالوسی تحمل بالایی به تنش شوری داشته باشند.

سپاسگزاری

REFERENCES

- Agrawal GK, Agrawal SK, Shibato J, Iwahashi H, Rakwal R (2003) Novel rice MAP kinases *OsMSRMK3* and *OsWJUMK1* involved in encountering diverse environmental stresses and developmental regulation. *Biochem. biophys. res.* 300:775-783
- Agrawal GK, Rakwal R, Iwahashi H (2002) Isolation of novel rice (*Oryza sativa* L.) multiple stress responsive MAP kinase gene, *OsMSRMK2*, whose mRNA accumulates rapidly in response to environmental cues. *Biochem. biophys. Res.* 294:1009-1016.
- Ahloowalia BS, Maluszynski M and Nichterlein K (2004) Global impact of mutation derived varieties. *Euphytica*, 135: 187-204.
- Ahloowalia BS, Maluszynski M (2001) Induced mutations—A new paradigm in plant breeding. *Euphytica* 118: 167-173.
- Anderson J A, Churchill G A, Autrique J E, Tanksley S D, Sorrells M E (1993) Optimizing parental selection for genetic linkage maps. *Genome* 36: 181-188.
- Ando, A. (1970) Mutant induction in rice by radiation combined with chemical protestants and mutagens. In rice breeding with induced mutant II. IAEA. Vienna. p: 1-5.
- Doyle J, (1987) A rapid procedure for DNA purification from small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem Bull.* 19:11-15.
- Fu SF, Chou WC, Huang DD, Huang HJ (2002) Transcriptional regulation of a rice mitogen activated protein kinase gene, *OsMAPK4*, in response to environmental stresses. *Plant & cell physiology* 43: 958-963.
- Garcia AB, Engler JDA, Claes B, Villarraoal R, Van Montagu M, Cerats T, Caplex A (1998) The expression of the salt responsive gene *salT* from rice is regulated by hormonal and developmental cues, *Planta* 207:172-180.
- González-Chavira, M. Torres-Pacheco, I., Villordo- Pineda, E. and Guevara-Gonzalez, R (2006) DNA markers. *Research Signpost. Adv. in Agri. and Food Biotech.* P: 99-134 ISBN: 81-7736-269-0. 6.
- Hosseini MH, Rabiei B, Ebadi AA, Kordrostami M (2018) The response of rice mutant lines to salinity stress at seedling stage using morphological traits and microsatellite markers. *Cereal Research Vol. 8, No. 1, 15-31.*
- Jeong JS, Kim YS, Redillas MC, Jang G, Jung H, Bang SW (2013) *OsNAC5* overexpression enlarges root diameter in rice plants leading to enhanced drought tolerance and increased grain yield in the field. *Plant Biotechnology. J.* 11: 101-114.
- Jeong MJ, Lee SK, Kim BG, Kwon TR, Cho W S, Park Y T, Lee J O, Kwon HB, Byun MO, Park S C (2006) A rice (*Oryza sativa* L.) MAP kinase gene, *OsMAPK44*, is involved in response to abiotic stresses. *Plant Cell, Tissue and*

- Organ Culture 85:151-160
- Kafi, M (2008) Saline agriculture and its necessity in Iran. Key Papers Proceedings the 10th Iranian Crop Sciences Congress. 19-21 August, Karaj, Iran. (In Persian with English abstract)
- Kawaura K, Mochida K, Ogihara Y (2008). Genome-wide analysis for identification of salt-responsive genes in common wheat. *Func. Integr. Genomics*, 8: 277-86.
- Kim JA, Agrawal GK, Rakwal R, Han KS, Kim KN, Yun CH, Heu S, Park SY, Lee YH, Jwa NS (2003) Molecular cloning and mRNA expression analysis of a novel rice (*Oryza sativa* L.) MAPK kinase, *OsEDR1*, an ortholog of Arabidopsis *AtEDR1*, reveal its role in defense/stress signalling pathways and development. *Biochemical and biophysical research communications* 300:868- 876.
- Kutubuddin AM, Ananda BD, Showkat AG, Tapan Kumar M (2015) Identification and analysis of novel salt responsive candidate gene based SSRs (*cgSSRs*) from rice (*Oryza sativa* L.). *BMC Plant Biology*. DOI 10.1186/s12870-015-0498-1
- Majidi Z, Ranjbar GA, Babaeian Nadali J, Nadali B (2011) Application of Mutation Modification Method to Evaluate Salinity Tolerant Rice (*Oryza sativa* L). *Environmental Stresses in Crop Sciences* 9: 387-394.
- Mishra B, Singh RK (2004) Impact of salt tolerant rice varieties. In: Proc. Of International Symposium on Rice: From Green Revolution to Gene Revolution, Directorate of Rice Research, Hyderabad, October 4-6 2004, Pp X1-vii-viii.
- Mohan, M. Nair, S., Bhagwat. A., Krishna. T. G., Yano. M., Bhatia, C. R. Sasaki, T (1997) Genome mapping, molecular markers and marker-assisted selection in crop plants. *Molecular breeding*. 3: 87-103. 87.
- Munns R (2005) Genes and salt tolerance: bringing them together, *New Phytol.* 645(167).
- Nakashima K, Tran LSP, Van Nguyen D, Fujita M, Maruyama K, Todaka D (2007) Functional analysis of a NAC-type transcription factor *OsNAC6* involved in abiotic and biotic stress-responsive gene expression in rice. *Plant J.* 51: 617–630.
- Nei M (1978) Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceeding of National Academy of Science USA* 70: 3321-3323
- Okamura M, Umemoto N, Onishi, N (2012) breeding glittering carnations by an efficient mutagenesis system. *Plant Biotechnology*. 29: 209-214.
- Parida AK, Das AB (2004) Salt tolerance and salinity effects on plants: a Review. *Otoxicology and Environ. Safety*. 60: 324-349
- Pervaiz Z, Afzal M, Xiao Y, Ancheng L (2003) Mechanism of salt tolerance in selected wheat cultivars.
- Ren ZH, Gao JP, Li LG, Cai XL, Huang W, Chao DY, Zhu MZ, Wang ZY, Luan S, Lin HX (2005) A rice quantitative trait locus for salt tolerance encodes a sodium transporter. *Nature Genetics* 37:1141-1146.
- Shereen A, Ansari R, Mumtaz S, Bughio H.R., Mujtaba SM., Shirazi MU., Khan, M.A. (2009) Impact of gamma irradiation induced changes on growth and physiological responses of rice under saline conditions. *Pakistan Journal of Botany* 41: 2487-2495.
- Singh KN, Sharma PC (2006) Salt tolerant varieties released for saline and alkaline soils. Central Soil Salinity Research Institute. India, Karnal, 132001.
- Singh RK, Gregorio GB, Javier EL, and Toledo, MC (2001) International rice soil stress tolerance observational

- nursery revisited from 1975-2000
- Sorkheh K, Shiran B, Gradziel T M, Epperson B, Martínez P, & Asadi E (2007). Amplified fragment length polymorphism as a tool for molecular characterization of almond germplasm: genetic diversity among cultivated genotypes and related wild species of almond, and its relationships with agronomic traits. *Euphytica*, 156, 327-344.
- Takasaki H, Maruyama K, Kidokoro S (2010) The abiotic stress-responsive NAC-type transcription factor *OsNAC5* regulates stress-inducible genes and stress tolerance in rice. *Mol. Genet. Genomics* 284: 173-183.
- Tanji K.K. and Wallender W.W. 2012. Nature and extent of agricultural salinity and sodicity. In: Wallender W.W., Tanji K.K. (eds.) *Agricultural Salinity Assessment and Management*. ASCE Manuals and Reports on Engineering Practices No. 71. ASCE, Reston. VA, USA, pp. 10-25.
- Xiong L, Yang Y (2003) Disease resistance and abiotic stress tolerance in rice are inversely modulated by an abscisic acid-inducible mitogen-activated protein kinase. *The Plant cell* 15: 745-759.
- Yilmaz A, and Boydak E (2006) The effect of cobalt-60 application yield components of cotton (*Gossypium barbadense* L.) *Pakistan Journal of Biological Sciences* 9(15): 2761-769.
- Mirdar Mansuri Sh, Babaeian Jelodar N, Bagheri N (2012) Effect of NaCl stress on Iranian rice genotypes in reproductive stage on the base of tolerance indexes and screen by Biplot Method. *J. of Plant Production* 19(1): 67-78.
- Akber M, Khush GS and Lambers DHR (1985) Genetics of salt tolerance in rice. In: *Rice Genetics*. IRRI, Los Banos, Laguna, Philippines, pp 399-409.
- Abdollahi Mandoulakani B, Azizi H (2014) Identification of ISSR markers associated with morphological traits in cultivated alfalfa (*Medicago sativa* L.) populations. *Journal of Cellular and Molecular Researches* 27: 260-268. 27210.
- Maccaferri M, Stefanelli S, Rotondo F, Tuberosa R, Sanguineti MC (2007) Relationships among durum wheat accessions. I. Comparative analysis of SSR, AFLP, and phenotypic data. *Genome* 50: 373-384. 10.1139/g06-151.
- Bohn M, Utz HF, Melchinger AE (1999) Genetic similarities among winter wheat cultivars determined on the basis of RFLPs, AFLPs, and SSRs and their use for predicting progeny variance. *Crop Science* 39: 228-237.
- Jahani M, Nematzadeh Gh A, Mohammadi-Nejad Gh (2016) Genetic diversity analysis in a global panel of rice genotypes by microsatellites. *Agri. Biotech. J. by Shahid Bahonar Uni. of Kerman* 8(1): 19-32.
- Chesnokov YV, Artemyeva A (2015) Evaluation of the measure of polymorphism information of genetic diversity. *Agri Biol* 50(5): 571-578.
- Norollahi N (2018) Screening of Rice M7 Mutant Lines Using Various Salinity (With Morphological and SSR Molecular Markers) Concentrations and Yield Comparison of Superior Lines. *Sari Agricultural Sciences and Nutural Resources University*.