



بررسی تحمل به شوری در برخی ارقام کلزا با استفاده از صفات مورفوفیزیولوژیک و نشانگرهای ISSR

علی اصغری^۱، شیوا محمدنیا^۲ و هاجر فلاحی^۳

۱- دانشیار، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه محقق اردبیلی، (نویسنده مسوول: ali_asgharii@yahoo.com)

۲ و ۳- دانشجوی دکتری و کارشناس ارشد، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه محقق اردبیلی

تاریخ دریافت: ۹۴/۲/۲۷ تاریخ پذیرش: ۹۵/۹/۲۳

چکیده

کلزا (*Brassica napus* L.) یکی از مهم‌ترین گیاهان روغنی جهان محسوب می‌شود. از طرفی خاک‌های شور و شوری آب آبیاری از مهم‌ترین عوامل تنش‌زای محیطی در تولید کلزا می‌باشند. به منظور بررسی تحمل به شوری ارقام کلزا در مرحله گیاهچه از لحاظ صفات مورفوفیزیولوژیک و بررسی ارتباط این صفات با نشانگرهای ISSR، ۱۵ رقم کلزا در دو سطح تنش شوری ۱۵۰ میلی‌مولار و ۲۵۰ میلی‌مولار و شرایط بدون تنش به صورت آب کشت در شرایط گلخانه‌ای مورد بررسی قرار گرفتند. در این مطالعه تنش شوری موجب کاهش اکثر صفات مورد ارزیابی در ارقام کلزا به جز محتوای سدیم و نسبت سدیم به پتاسیم شد. نتایج مقایسه میانگین و تجزیه خوشه‌ای نشان داد که رقم‌های SLMO46 و PF از نظر اکثر صفات در شرایط مختلف مورد بررسی نسبت به بقیه ارقام برتر بوده در حالی که، ارقام Licord و Hayola60 کمترین مقدار را به خود اختصاص دادند. در بررسی مولکولی با استفاده از ۱۱ آغازگر ISSR، ۴۵ نوار چندشکل در ارقام مورد مطالعه کلزا تولید شد. میانگین محتوای اطلاع چندشکلی و شاخص نشانگری برای کلیه آغازگرها به ترتیب ۰/۲۸۲ و ۱/۱۰۸ به دست آمد. در تجزیه خوشه‌ای با استفاده از داده‌های ISSR و فاصله ژنتیکی نی، ارقام کلزا به سه گروه تقسیم شدند. کمترین فاصله ژنتیکی بین دو رقم Jewel و Zarfam (۰/۰۷۹) و بیشترین فاصله بین ارقام Quantum و Hyola60 با SLMO46 (۰/۳۲) به دست آمد.

واژه‌های کلیدی: تنش، شوری، کلزا، صفات مورفولوژیک، نشانگر مولکول

مقدمه

عوامل اصلی کاهش رشد گیاهان در شرایط شوری می‌باشد. با توجه به نقش اساسی پتاسیم در فعالیت‌های مختلف فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی گیاه نظیر باز و بسته شدن روزنه‌ها، تنظیم اسمزی، فعال کردن آنزیم‌های مختلف، افزایش هیدراسیون، اثر کلئیدی و دخالت در نقل و انتقال مواد، کاهش آن مانع از رشد و نمو طبیعی گیاه می‌شود (۲۶). هنگامی که گیاه در شرایط شور رشد می‌کند فعالیت فتوسنتزی آن کاهش می‌یابد و در نتیجه میزان رشد، سطح برگ و محتوای کلروفیل کاهش و فلورسانس کلروفیل افزایش می‌یابد (۴۳). در بررسی گیاه گندم (۳)، شنبلله (۵)، گونه‌های مختلف براسیکا (۷) و نیز ارقام مختلف کلزا (۱۰) ارتباط مستقیمی بین فتوسنتز و مقدار ماده خشک حاصل در شرایط تنش شوری گزارش شده است.

با توجه به این که صفات مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی در تمام مراحل رشد گیاه قابل اندازه‌گیری نمی‌باشند، در سال‌های اخیر زیست‌شناسی مولکولی ابزارهای مناسبی را برای تجزیه و تحلیل جامع‌تر در مورد شناسایی موجودات زنده فراهم کرده است. در این میان نشانگرهای مولکولی مبتنی بر DNA برای مطالعات ژنتیکی و مولکولی مورد استفاده قرار گرفته است (۴۲). ISSR، نشانگرهای نیمه انتخابی مبتنی بر PCR هستند که بر اساس نواحی ریزماهورهای هدف طراحی شده‌اند. چائوزی و همکاران تنوع ژنتیکی ۲۴ رقم کلزای بهاره و پاییزه سوئدی و نیمه پاییزه چینی را به کمک نشانگرهای ISSR بررسی کردند. تجزیه خوشه‌ای با استفاده از روش UPGMA بر اساس ۱۲۵ نوار چند شکل تکثیر شده با ۲۰ آغازگر، ۲۴ رقم کلزا را به سه گروه منتسب کرد. این مطالعه نشان داد که نشانگرهای ISSR می‌توانند به‌عنوان

دانه‌های روغنی بعد از غلات دومین منبع مهم تامین انرژی مورد نیاز انسان هستند (۳۴). کلزا (*Brassica napus* L.) یکی از مهم‌ترین گیاهان روغنی جهان محسوب می‌شود و مقام سوم را پس از سویا و نخل روغنی در تامین روغن جهان و ایران دارد (۱۶). دانه‌های کلزا به‌طور متوسط دارای ۴۵-۴۰ درصد روغن بوده و منبع با ارزشی برای تامین روغن خوراکی و نیز مصارف صنعتی است (۳۳). با توجه به افزایش روز افزون جمعیت جهان، که تا سال ۲۰۵۰ به ۹ میلیارد نفر خواهد رسید، در آینده امنیت غذایی انسان‌ها مهم‌ترین چالش پیش‌روی دولت‌ها خواهد بود (۱۲). امنیت غذایی انسان‌ها توسط عوامل مختلفی مانند تنش‌های زنده و غیر زنده به‌خطر می‌افتد (۱۵). تنش شوری از مهم‌ترین تنش‌های محیطی است که بهره‌برداری کشاورزی را محدود می‌کند (۲۸). خاک‌های شور و شوری آب آبیاری از مهم‌ترین عوامل تنش‌زای محیطی در تولید کلزا می‌باشند (۱۵). شوری از طریق کاهش پتانسیل اسمزی خاک یا تنش آبی و تنش یونی سبب کاهش رشد و نمو گیاه می‌گردد. در اثر تنش یونی حاصل از شوری جذب عناصر و یون‌های ضروری مورد نیاز گیاه مانند کلسیم، منیزیم، فسفر و نیترات کاهش می‌یابد (۸). تاثیرات مضر اصلاح بر گیاهان نتیجه تلفیق عوامل مختلفی می‌باشد که می‌توان نتیجه آن را در گیاه به‌صورت کاهش رشد (۱۴) کاهش جذب آب که با کاهش سنتز پروتئین، تعرق، انتقال یون و در نهایت با کاهش محصول مشاهده کرد (۱). افزایش یون سدیم در محیط ریشه سبب کاهش میزان جذب یون پتاسیم و پایین آمدن نسبت پتاسیم به سدیم می‌گردد (۱۳). عدم تعادل عناصر غذایی در بخش هوایی یکی از

سانتی گراد، دمای دوره تاریکی 3 ± 18 درجه سانتی گراد و با طول دوره روشنایی و تاریکی مشخص که تابع طول روز بود، انجام شد. آزمایش به صورت کرت‌های خرد شده در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی در سه تکرار انجام گرفت. بذور هر رقم توسط هیپوکلریت سدیم ۲ درصد به مدت ۱۰ دقیقه ضدعفونی شدند. به منظور جوانه‌زنی یکنواخت، بذور در ظروف پتری دیش حاوی کاغذ صافی مرطوب در دستگاه ژرمیناتور (دمای ۲۵ درجه سانتی گراد و رطوبت ۶۰ درصد) قرار داده شدند. پس از جوانه‌زنی، بذور با جوانه‌های یکنواخت به ظروف ۱۲ لیتری حاوی محلول غذایی هوگلند نصف غلظت (۲۰)، منتقل شدند. برای نگهداری و کشت گیاهچه‌ها، بذورهای جوانه زده، روی سطح تیوب‌های کوچک که بر روی صفحه یونولیت با ضخامت ۲ سانتی‌متر واقع در روی ظروف محیط کشت که در زیر آن‌ها توری تعبیه شده بود، قرار داده شدند. برای جلوگیری از خفه شدن گیاهچه‌ها، محلول غذایی هوگلند توسط پمپ آکواریوم هوادهی می‌شد.

روشی کارآمد و مناسب برای ارزیابی تنوع ژنتیکی ژرم پلاسما کلزا استفاده کردند (۱۷). از نشانگرهای ISSR به عنوان وسیله‌ای در شناسایی ژنوتیپ‌ها و همچنین مطالعه ساختار جمعیتی گونه‌های گیاهی مانند کلزا (۲۵)، گندم (۳۰) و سیب‌زمینی (۳۷) استفاده شده است. هدف از تحقیق حاضر ارزیابی پانزده رقم کلزا از نظر مقاومت به تنش شوری و گروه‌بندی آن‌ها بر اساس صفات اندازه‌گیری شده و همچنین تعیین تنوع ژنتیکی با استفاده از نشانگر ISSR بود.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق پانزده رقم کلزا از بخش دانه‌های روغنی موسسه نهال و بذر کرج تهیه شد و از نظر تحمل به تنش شوری در مرحله گیاهچه در مهر ماه سال ۱۳۸۹ در گلخانه دانشکده کشاورزی دانشگاه محقق اردبیلی از طریق کشت هیدروپونیک مورد ارزیابی قرار گرفتند. آزمایش در گلخانه با رطوبت نسبی ۳۸ درصد، دمای دوره روشنایی 5 ± 20 درجه

جدول ۱- اسامی ارقام کلزای مورد مطالعه در شرایط تنش شوری

Table 1. The names of studied *Brassica napus* cultivars in salinity stress condition

شماره	نام رقم	شماره	نام رقم
۱	PF	۹	Zarfam
۲	Hyola 401	۱۰	Jewel
۳	Adder	۱۱	Hyola 60
۴	Licord	۱۲	Talaye
۵	SLM 046	۱۳	Orieint
۶	SLM 043	۱۴	Hyola 308
۷	Okapia	۱۵	Quantum
۸	RGS		

کرت اصلی شامل سطوح تنش ۱۵۰، ۲۵۰ میلی‌مولار کلرید سدیم (NaCl) (۶) و شاهد و کرت فرعی شامل ۱۵ رقم کلزا (جدول ۱) بود.

طریق غوطه‌ور ساختن ریشه در آب مقطر در درون یک استوانه مدرج با حجم ۱۰ سانتی‌متر مکعب اندازه‌گیری شد (۴). پس از جدا کردن ریشه‌ها با استفاده از خط کش بر حسب سانتی‌متر طول ریشه اندازه‌گیری شد. جهت محاسبه وزن خشک ریشه و وزن خشک اندام هوایی نمونه‌ها به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و سپس با استفاده از ترازوی دیجیتالی با دقت ۰/۰۰۱ اندازه‌گیری شدند. از مجموع وزن خشک ریشه و اندام هوایی، صفت عملکرد بیولوژیک و از تقسیم وزن خشک ریشه به وزن خشک اندام‌های هوایی، صفت نسبت ریشه به اندام هوایی به دست آمد. برای اندازه‌گیری سدیم و پتاسیم، نمونه‌های اندام هوایی کلزا به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۷۵ درجه سانتی‌گراد در آون خشک شد و وزن آن‌ها اندازه‌گیری شد. سپس، نمونه‌های خشک شده گیاهی به وسیله آسیاب به صورت پودر در آمد. یک گرم از پودر حاصل در بوته چینی ریخته شد و در کوره الکتریکی به مدت ۴ ساعت در دمای ۵۵۰ درجه سانتی‌گراد خاکستر شد. سپس، خاکستر بدست آمده به وسیله ۱۰ میلی‌لیتر اسید کلریدریک ۲ مولار عصاره‌گیری شد و جهت اندازه‌گیری عناصر پتاسیم و سدیم توسط دستگاه فیلم فتومتر مورد استفاده قرار گرفت (۲۳).

۲۰ روز پس از کشت و در مرحله سه برگچه‌ای، تنش شوری با استفاده از کلرید سدیم با مقادیر ۱۵۰ و ۲۵۰ میلی‌مولار اعمال شد. برای جلوگیری از شوک اسمزی، کلرید سدیم در سه نوبت با مقدار مساوی به گلدان‌ها اضافه شد. برای این منظور، مقدار نمک مورد نیاز برای رسیدن ۱۲ لیتر محلول هر گلدان به غلظت‌های مذکور محاسبه شد. کلرید سدیم مورد نیاز به سه قسمت مساوی تقسیم و هر دو روز یک بار به گلدان‌ها اضافه گردید. ۲۰ روز پس از اعمال تنش شوری نمونه‌برداری از بخش‌های مختلف گیاهچه‌ها به منظور اندازه‌گیری صفات کلروفیل برگ، سطح ریشه، حجم ریشه، طول ریشه، عملکرد بیولوژیک، نسبت ریشه به اندام هوایی، وزن خشک ریشه، وزن خشک اندام هوایی، اندازه‌گیری سدیم و پتاسیم انجام شد.

میزان کلروفیل با استفاده از برگ‌های جوان و توسعه یافته به وسیله دستگاه کلروفیل‌متر مدل spad-502 از کمپانی Konica Minolta اندازه‌گیری شد. این دستگاه با اندازه‌گیری طیف جذبی در محدوده‌ی نور آبی (۴۰۰-۵۰۰nm) و در محدوده‌ی نور قرمز (۵۰۰-۶۰۰nm) میزان کلروفیل را به صورت غیر تخریبی تعیین می‌کند. صفت سطح ریشه با استفاده از روش اتکینسون (۴) برآورد گردید. حجم ریشه از

تنش شوری به غیر از صفت نسبت وزن خشک ریشه به اندام هوایی در بقیه صفات اختلاف معنی داری را در سطح احتمال یک درصد نشان دادند. در حالیکه برهمکنش شوری در رقم در تمامی صفات غیر معنی دار بود (جدول ۳).

مقایسه میانگین سطوح مختلف شوری با روش حداقل اختلاف معنی دار (LSD) در سطح احتمال پنج درصد نشان داد که بیشترین میزان برای صفات مورد بررسی در سطح شاهد مشاهده شده که با افزایش شوری از میزان وزن تر اندام هوایی و ریشه، وزن خشک اندام هوایی و ریشه، طول ریشه، حجم ریشه، سطح ریشه، عملکرد بیولوژیک و میزان پتاسیم موجود در اندام هوایی به طور چشمگیری کاسته شد، در حالی که، میزان سدیم در اندام هوایی و نیز نسبت سدیم به پتاسیم روند افزایشی را نشان دادند.

نتایج مقایسه میانگین همچنین نشان داد که صفات مقدار کلروفیل و فلوتورسانس کلروفیل اختلاف معنی داری را در سطح شوری ۲۵۰ میلی مولار نشان دادند (جدول ۳). یکی از عوامل کاهش کلروفیل افزایش سدیم در اندام های هوایی می باشد که سبب تجزیه کلروفیل در برگ ها می شود (۱۹). غلظت بالای سدیم در برگ ها باعث تخریب سریع تر کلروفیل می شود که برخی آن را ناشی از فعالیت آنزیم کلروفیلاز عنوان کرده اند (۳۹)، بطوریکه برخی از محققین معتقدند که توانایی حفظ کلروفیل در گیاه سبب بهبود وضعیت قدرت رویش گیاهچه در شرایط تنش شوری می شود (۲۲). شوری باعث افزایش یون سدیم در اندام هوایی کلزا شد (جدول ۳). افزایش بیش از حد سدیم در سیتوپلاسم فعالیت های آنزیمی ۵۰ نوع آنزیم که برای فعالیت خود احتیاج به پتاسیم دارند، را مختل می کند. چون، یون سدیم نمی تواند نقش یون پتاسیم را در این آنزیم ها ایفا کند. بنابراین، با افزایش یون سدیم در سیتوپلاسم و برتری این یون در رقابت با یون پتاسیم جهت اتصال به آنزیم های مورد نظر، فعالیت های متابولسمی گیاه دچار اختلال می گردد (۴۴). همچنین، از آثار سوء دیگر تجمع بیش از حد سدیم در سیتوپلاسم، ایجاد اختلال در یکپارچگی ساختار و عمل غشاهای سلولی می باشد (۴۶). محققین نسبت $Na^+K^+ / ^+$ را به عنوان یک پارامتر قابل اطمینان برای تعیین تحمل به تنش شوری در گیاه زراعی کلزا گزارش کرده اند (۱۱). رقم Hayola 308 بیشترین و رقم Hyola 60 کمترین وزن تر اندام هوایی را داشتند. از نظر صفت وزن خشک اندام هوایی نیز رقم SLMO46 دارای بیشترین میزان این صفت بود. در حالی که، ارقام Licord، Hyola60 و Jewel دارای کمترین میزان وزن خشک اندام هوایی بودند (جدول ۴). افزایش شوری باعث کاهش مقدار ماده خشک در ارقام مختلف کلزا می شود (۲). کاهش ماده خشک به سبب کاهش سطح برگ گیاه، کاهش فشار آماس سلول و کاهش میزان فتوسنتز در شرایط تنش شوری رخ می دهد (۹). محققین میزان تحمل به شوری در کلزا را با مقدار ماده خشک تولیدی در مرحله گیاهچه ای متناسب دانسته اند (۷). بیشترین مقدار صفت وزن تر ریشه مربوط به ارقام PF و SLMO46 و کمترین مقدار آن مربوط به رقم Licord بود (جدول ۴). از نظر وزن خشک ریشه، رقم SLMO46 دارای بیشترین مقدار و ارقام Licord،

برای تجزیه مولکولی استخراج DNA به روش CTAB مطابق با روش سقایی معروف و همکاران (۴۱) انجام گرفت. برای تعیین کمیت و کیفیت DNA استخراج شده از الکتروفورز ژل آغاز ۰/۸ درصد و دستگاه اسپکتروفومتر استفاده شد. رقم Hyola 401 به علت داشتن DNA با کیفیت پایین باندی تولید نکرد. بعد از اطمینان از کمیت و کیفیت بقیه ارقام، DNA های استخراج شده رقیق شدند. برای تکثیر قطعات DNA ژنومی از ۱۱ آغازگر ISSR تهیه شده از شرکت متابیون کره استفاده شد. واکنش زنجیره ای پلیمرز با حجم ۲۰ میکرولیتر انجام گردید.

چرخه های دمایی و زمانی واکنش PCR شامل: مرحله اول چهار دقیقه واسرشته سازی اولیه (دمای $94^{\circ}C$) مرحله دوم ۳۵ سیکل شامل ۳۰ ثانیه واسرشته سازی (دمای $94^{\circ}C$)، ۳۰ ثانیه اتصال (دمای $53-47^{\circ}C$)، یک دقیقه تکثیر (دمای $72^{\circ}C$)، مرحله سوم ده دقیقه تکثیر نهایی (دمای $72^{\circ}C$)، مرحله چهارم پنج دقیقه (دمای $4^{\circ}C$) صورت گرفت. سپس محصول PCR بر روی ژل آغاز ۱/۲ درصد الکتروفورز گردید. امتیازدهی نوارها به صورت حضور (۱) و عدم حضور (۰) انجام شد. تعداد نوارهای چند شکل و یک شکل هر آغازگر و میزان تنوع ژنی بین ژنوتیپ ها با استفاده از شاخص تنوع ژنی نی (۳۱) برآورد شد. شاخص اطلاعات شانون (۴۵) نیز برای تنوع ژنتیکی بین ژنوتیپ ها با استفاده از فرمول $H = -\sum f_i \ln(f_i)$ (۴۵) f_i فراوانی یک نوار ISSR در جمعیت، L_n لگاریتم بر مبنای عدد نپری) محاسبه شد. همچنین، محتوای اطلاعات چند شکلی (PIC) و شاخص نشانگر (MI) هر آغازگر محاسبه گردید. برای محاسبه PIC از فرمول $PIC_i = 2f_i(1-f_i)$ استفاده شد که در آن f_i فراوانی قطعه (آلل) تکثیر شده و $1-f_i$ فراوانی آلل نول (عدم وجود نوار) می باشد (۴۰). شاخص نشانگر (MI) از حاصلضرب PIC در تعداد نوارهای چند شکل هر آغازگر بدست آمد (۳۶). گروه بندی ژنوتیپ ها با استفاده از تجزیه خوشه ای به روش دورترین همسایگی و ضریب تشابه SM انجام شد. مناسب بودن روش تجزیه خوشه ای با محاسبه ضریب همبستگی کوفنتیک تعیین گردید، که از بین ضرایب تشابه SM، جاکارد و دایس، ضریب تشابه SM بیشترین همبستگی کوفنتیک را نشان داد. برای انجام تجزیه های فوق از نرم افزارهای SPSS v.19، GeneAlex 6.4، NTSYS 2.2 و PopGen32 استفاده گردید.

نتایج و بحث

تجزیه واریانس صفات به صورت کرت های خرد شده در قالب طرح بلوک های کامل تصادفی صورت گرفت، اما با توجه به این که در صفات مورد مطالعه خطای اول معنی دار نشد، لذا مجدداً تجزیه واریانس به صورت فاکتوریل در قالب طرح بلوک های کامل تصادفی انجام گرفت. تجزیه واریانس صفات اندازه گیری شده نشان داد که اختلاف معنی داری بین ارقام از لحاظ صفات وزن تر اندام هوایی و ریشه، وزن خشک ریشه، حجم ریشه، سطح ریشه در سطح احتمال یک درصد و برای صفات وزن خشک اندام هوایی، طول ریشه و عملکرد بیولوژیک در سطح احتمال پنج درصد وجود داشت. سطوح

شناخته نشده‌اند، اما معلوم شده است که تحمل به شوری تا حد زیادی مربوط به تجمع کم سدیم در بافت گیاه است. برای رسیدن به این ویژگی مهم بایستی ارقام گیاهان زراعی از توانایی بسیار بالایی (نزدیک به ۱۰۰٪) در انتقال مجدد سدیم به بیرون از ریشه برخوردار باشند (۱۸).

افزایش توانایی در جذب انتخابی پتاسیم از محیطی که دارای مقادیر بالای سدیم است، ممکن است اهمیت زیادی در تحمل به شوری داشته باشد (۱۵). رشید و همکاران (۳۸) در بررسی تحمل به شوری ارقام مختلف گندم، افزایش معنی‌داری در میزان سدیم با افزایش سطوح شوری مشاهده نمود که دارای تنوع ژنتیکی بالایی در جذب سدیم در بین ارقام بود. در جو نیز گزارشاتی مبنی بر افزایش غلظت سدیم بافت بخش هوایی و کاهش میزان پتاسیم محتوی بافت بخش هوایی با افزایش شوری مشاهده شده است (۲۷). در سطح تنش ۲۵۰ میلی‌مولار، سه گروه مجزا مشخص شد (شکل ۱ ج)، که در بین آن‌ها گروه اول شامل ارقام (RGS, SLMO46, Quantum, SLMO43, Zarfam, PF, Hyola401) بیشترین مقادیر صفات وزن تر و خشک اندام هوایی و ریشه، حجم و سطح ریشه، طول ریشه، نسبت وزن خشک ریشه به اندام هوایی، فلوئورسانس کلروفیل و عملکرد بیولوژیک بود. گروه سوم از لحاظ این صفات پایین‌ترین مقدار را داشت (جدول ۷).

برای بررسی چندشکلی‌های DNA بین ارقام کلزا تعداد ۱۱ آغازگر ISSR جهت بررسی تنوع بین ارقام کلزا استفاده گردید. این آغازگرها در مجموع ۴۵ نوار چندشکل تولید کردند. تعداد قطعات تکثیر شده با آغازگرهای مختلف بسیار متفاوت بود. به طوری که، آغازگرهای شماره ۱۱، ۱۶ و ۲۲ تنها با دو نوار چندشکل و میانگین درصد چند شکلی ۳۷/۷۸٪ کمترین آغازگر شماره ۸ با ۷ نوار چند شکلی و درصد چند شکلی ۷۷/۷۸٪ بیشترین میزان چند شکلی را نشان دادند (جدول ۸). محبوب و همکاران (۲۵) ۳۶ زنوتیپ کلزا را با استفاده از ۱۳ نشانگر ISSR مورد ارزیابی قرار دادند و در مجموع ۲۵۷ مکان چندشکلی مشاهده کردند و نشانگر ISSR را برای شناسایی تفاوت‌های بین گونه‌ای و همچنین داخل گونه‌ای در مطالعات فیلوژنتیکی و بررسی ساختار ژنتیکی زنوتیپ‌های کلزاهمزمان با بکارگیری صفات مورفولوژیکی پیشنهاد کردند.

به‌منظور گروه‌بندی ارقام کلزا بر اساس داده‌های ISSR، تجزیه خوشه‌ای به‌روش دورترین همسایگی با استفاده از ماتریس شباهت SM انجام شد (شکل ۳). مناسب بودن روش تجزیه خوشه‌ای با توجه به معنی‌دار بودن ضریب همبستگی کوفنتیک در سطح احتمال یک درصد مشخص شد ($r=0/82^{**}$).

Hyola60 و Adder کمترین مقدار را از نظر صفت مذکور داشتند (جدول ۴). از جمله دلایلی که می‌توان برای این کاهش وزنی در گیاهان مورد مطالعه بیان نمود، از بین رفتن تعادل یونی و تعادل اسمزی است که از جمله آثار مخرب شوری است و ریشه اولین اندامی است که به دلیل جذب عناصر به‌طور مستقیم با تنش مواجه می‌گردد (۳۵). طول ریشه در مراحل گیاهچه و گیاه کامل با افزایش غلظت شوری به دلیل کاهش و اختلال در فعالیت‌های زیستی و متابولیسمی کاهش می‌یابد که این امر در گیاهان مختلف نظیر گندم گزارش شده است (۲۴). نتایج مقایسه میانگین ارقام نشان‌داد که بیشترین اندازه طول ریشه و سطح ریشه را رقم SLMO46 و کمترین مقدار طول ریشه را رقم RGS داشت. رقم PF از لحاظ حجم و سطح ریشه بیشترین مقدار، رقم Hyola60 کمترین مقدار سطح ریشه و رقم Licord کمترین مقدار حجم ریشه را داشت. عملکرد بیولوژیک در رقم SLMO46 بالاترین مقدار و در ارقام Hyola60 و Licord کمترین مقدار را داشت. در اکثر مطالعات انجام شده روی کلزا (۲۱) افزایش شوری اثر منفی معنی‌داری بر عملکرد بیولوژیک داشته است که در نتیجه کاهش سطوح فتوستز کننده و مصرف بیش از حد انرژی در جهت کنترل و کاهش اثر تنش شوری است. شوری باعث افزایش یون سدیم در اندام هوایی کلزا شد (جدول ۳). در نتیجه سبب کاهش میزان دسترسی گیاهچه‌های کلزا به آب می‌گردد. لذا، تنش خشکی حاصل از شوری اولین عامل کاهنده رشد گیاه محسوب شده و در ادامه سدیم و کلر در گیاه تجمع یافته و سبب بروز تنش یونی در گیاه می‌گردد. اشرف (۷) با مطالعه اثر غلظت‌های مختلف شوری در شش گونه براسیکا مشاهده کردند که با افزایش غلظت شوری، میزان غلظت یون سدیم بسیار زیاد و مقدار یون پتاسیم بسیار کم شد. در اثر تنش یونی جذب عناصر ضروری مورد نیاز گیاه مانند پتاسیم، کلسیم، فسفر، نیتراژ و منیزیم کاهش می‌یابد. برآیند این عوامل منجر به کاهش رشد و تولید ماده خشک می‌گردد.

گروه‌بندی ارقام کلزا با استفاده از تجزیه خوشه‌ای بر اساس میانگین استاندارد شده صفات مورفولوژیک به‌روش Ward در سه سطح شاهد، تنش شوری ۱۵۰ و ۲۵۰ میلی‌مولار به‌طور جداگانه انجام شد (شکل ۱). برای تعیین محل مناسب برای برش نمودار درختی از تجزیه واریانس چند متغیره استفاده شد. در سطوح شاهد، تنش ۱۵۰ میلی‌مولار و ۲۵۰ میلی‌مولار ارقام به سه گروه مجزا تقسیم شدند (شکل ۱).

در سطح شاهد ارقام خوشه اول PF و SLMO46 از لحاظ اکثر صفات نسبت به میانگین کل برتری داشتند. میانگین ارقام گروه سوم در اکثر صفات نسبت به تاکنون مکانیسم‌های بیولوژیک و مولکولی در گیاهان مقاوم به شوری به‌خوبی

جدول ۲- تجزیه واریانس صفات مورد مطالعه کلزا در شرایط تنش شوری

Table 2. Analysis of variance for studied traits of *Brassica napus* under salinity stress condition

میانگین مربعات															
منابع تغییر	درجه آزادی	وزن تر اندام هوایی	وزن تر ریشه	وزن خشک اندام هوایی (S)	وزن خشک ریشه (R)	طول ریشه	حجم ریشه	سطح ریشه	R/S	عملکرد بیولوژیکی	کلروفیل	F _v /F _m	سدیم	پتاسیم	نسبت سدیم به پتاسیم
تکرار	۲	۶/۷۴ ^{ns}	۰/۱۲۶ ^{**}	۰/۰۸۸ ^{ns}	۰/۰۰۹ ^{**}	۶۲/۶۹ ^{**}	۰/۰۱۱ ^{ns}	۷/۱۹ ^{ns}	۰/۰۰۴ ^{**}	۰/۱۱۳ ^{ns}	۹۶/۴۲ ^{**}	۰/۰۰۳ ^{ns}	۰/۴۳ ^{ns}	۲/۶۶ ^{**}	۰/۸۳ ^{**}
شوری	۲	۶۴۹/۶۴ ^{**}	۲/۹۸ ^{**}	۴/۸۹ ^{**}	۰/۳۴۷ ^{**}	۱۰۳۵/۳۱ ^{**}	۲/۵۴ ^{**}	۱۴۹۳/۰۳ ^{**}	۰/۰۰۳ ^{ns}	۶/۱۲ ^{**}	۱۳۹۰/۶ ^{**}	۰/۰۷۴ ^{**}	۱۲۸/۴۹ ^{**}	۴۸/۳۴ ^{**}	۷۴/۲۷ ^{**}
رقم	۱۴	۹/۵۴ ^{**}	۰/۰۶۸ ^{**}	۰/۷۵ ^{**}	۰/۰۰۶ ^{**}	۱۲/۶۵ ^{**}	۰/۰۶۷ ^{**}	۳۱/۰۷ ^{**}	۰/۰۰۱ ^{ns}	۰/۰۹۹ ^{**}	۹/۸۴ ^{ns}	۰/۰۰۳ ^{ns}	۰/۱۶ ^{ns}	۰/۳۹ ^{ns}	۰/۱۳ ^{ns}
رقم شوری	۲۸	۲/۵۴ ^{ns}	۰/۰۱۷ ^{ns}	۰/۰۲۹ ^{ns}	۰/۰۰۲ ^{ns}	۳/۸۶ ^{ns}	۰/۰۱۷ ^{ns}	۹/۰۸ ^{ns}	۰/۰۰۱ ^{ns}	۰/۰۳۸ ^{ns}	۱۲/۴۶ ^{ns}	۰/۰۰۲ ^{ns}	۰/۱۳ ^{ns}	۰/۲۹ ^{ns}	۰/۰۸ ^{ns}
اشتباه	۸۸	۳/۷۹	۰/۰۱۶	۰/۰۳۳	۰/۰۰۲	۶/۲۲	۰/۰۰۲	۹/۶۰۳	۰/۰۰۱	۰/۰۴۱	۱۲/۴۱	۰/۰۰۱	۰/۱۴	۰/۲۲	۰/۰۹
ضریب تغییرات		۲۹/۹۸	۱۵/۹۹	۲۸/۴۳	۱۷/۳۵	۸/۹	۱۸/۲۲	۲۱/۰۴	۲۸/۲۳	۲۸/۴۸	۱۱/۵۵	۳/۹۷	۱۹/۰۳	۲۱/۶۴	۱۹/۴۴

ns و **: به ترتیب غیرمعنی دار و معنی دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد
F_v/F_m: نشان دهنده بیشینه کارایی کوانتومی فتوسنتز و معیاری از نحوه عملکرد فتوسنتز گیاهی است

جدول ۳- مقایسه میانگین بین سطوح شوری و شاهد در ارقام کلزا به روش حداقل اختلاف معنی دار (LSD)

Table 3. Mean comparison of control and salinity levels in *Brassica napus* cultivars using Least Significant Difference (LSD) method

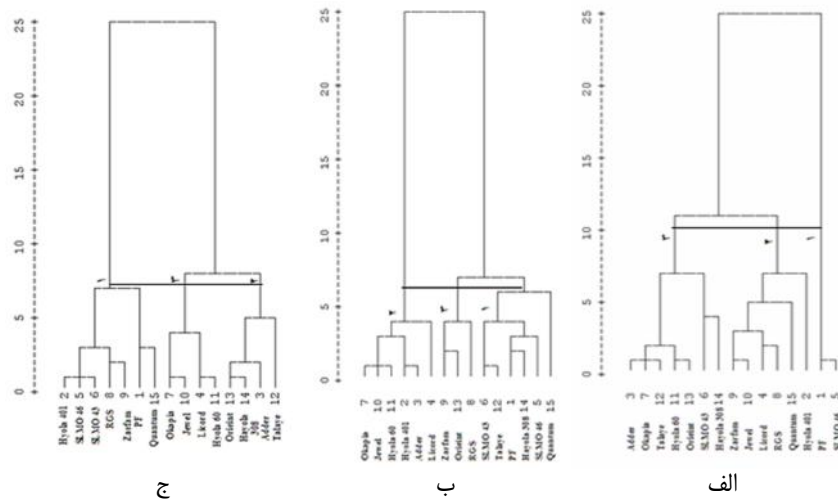
تیمار	وزن تر اندام هوایی (gr)	وزن تر ریشه (gr)	وزن خشک اندام هوایی (gr)	وزن خشک ریشه (gr)	طول ریشه (cm)	حجم ریشه (cm ³)	سطح ریشه (cm ²)	عملکرد بیولوژیکی (gr)	کلروفیل (mg.g-1 FW)	نسبت سدیم به پتاسیم	سدیم (ppm)	پتاسیم (ppm)	F _v /F _m
شاهد	۱۰/۳۴a	۱/۱۱a	۰/۹۹a	۰/۱۱a	۳۳/۲۳a	۱/۰۷a	۲۰/۸۱a	۱/۰۹a	۳۴/۲۱a	۰/۰۲۴c	۰/۰۷۷c	۳/۳۲a	۰/۸۲a
۱۵۰ Mm	۶/۴۱b	۰/۶۹b	۰/۶۰b	۰/۰۷b	۲۶/۹۸b	۰/۵۹b	۱۴/۰۲b	۰/۶۷b	۳۳/۲۰ a	۲/۴۹b	۳/۹۸b	۱/۲۹c	۰/۸۱a
۲۵۰ Mm	۲/۷۴c	۰/۲۹c	۰/۳۳c	۰/۰۴c	۲۳/۸c	۰/۳۰c	۹/۳۵c	۰/۳۷c	۲۴/۱۱ b	۷/۳۵ a	۱۳/۷۹a	۱/۹۲b	۰/۷۵b

تفاوت حروف در هر ستون نشان دهنده اختلاف معنی دار در سطح احتمال ۵ درصد می باشد

جدول ۴- مقایسه میانگین ارقام مورد مطالعه کلزا از نظر صفات مورفولوژیک با روش حداقل اختلافات معنی‌دار
Table 4. Mean comparison of morphological traits in studied *brassica napus* cultivars using least significant differences method

عملکرد بیولوژیک (gr)	سطح ریشه (cm ²)	طول ریشه (cm)	حجم ریشه (cm ³)	وزن خشک ریشه (gr)	وزن خشک اندام هوایی (gr)	وزن تر ریشه (gr)	وزن تر اندام هوایی (gr)	رقم
۰/۸۸۹ ^{ab}	۱۸/۲۳ ^a	۲۸/۷۷ ^{ac}	۰/۹۷ ^a	۰/۱۰۱ ^{ab}	۰/۷۹ ^{ab}	۱/۰۱ ^a	۷/۷۱ ^{ac}	PF
۰/۶۳۹ ^{cd}	۱۵/۲۲ ^{ad}	۲۶/۸۲ ^{bc}	۰/۷۵ ^{ad}	۰/۰۷۶ ^{bc}	۰/۵۶ ^{cd}	۰/۷۶ ^{ad}	۵/۵۹ ^c	Hyola 401
۰/۶۴۱ ^{cd}	۱۳/۱۹ ^{bd}	۲۸/۰۵ ^{ac}	۰/۵۱ ^{ce}	۰/۰۵۶ ^{de}	۰/۵۸ ^{cd}	۰/۵۳ ^d	۶/۲۱ ^a	Adder
۰/۵۹۳ ^d	۱۲/۷۶ ^{cd}	۲۸/۶۸ ^{ac}	۰/۴۹ ^e	۰/۰۵۸ ^{de}	۰/۵۴ ^d	۰/۵۱ ^f	۵/۲۸ ^{cd}	Licord
۰/۹۲۶ ^a	۱۸/۱۸ ^a	۳۰/۶۱ ^a	۰/۹۳ ^{ab}	۰/۱۰۵ ^a	۰/۸۲ ^a	۰/۹۶ ^a	۷/۸۲ ^{ab}	SLMO 46
۰/۷۶۶ ^{ad}	۱۵/۸۴ ^{ac}	۲۸/۸۵ ^{ab}	۰/۷۳ ^{ad}	۰/۰۸۸ ^{ac}	۰/۶۸ ^{ad}	۰/۷۷ ^{ad}	۶/۵۴ ^{ac}	SLMO 43
۰/۶۵۳ ^{cd}	۱۳/۳۸ ^{bd}	۲۸/۳۳ ^{ac}	۰/۵۲ ^{ce}	۰/۰۵۹ ^{de}	۰/۵۹ ^{bd}	۰/۵۵ ^{ef}	۵/۹ ^{bc}	Okapia
۰/۷۲۷ ^{ad}	۱۴/۱۹ ^{bd}	۲۶/۰۳ ^c	۰/۷۱ ^{ac}	۰/۰۷۴ ^{bc}	۰/۶۵ ^{ad}	۰/۷۵ ^{ad}	۶/۸۷ ^{ac}	RGS
۰/۶۸۸ ^{bd}	۱۳/۶۵ ^{bd}	۲۷/۹۲ ^{ac}	۰/۵۵ ^{ce}	۰/۰۶۳ ^{ce}	۰/۶۳ ^{ad}	۰/۵۸ ^{bf}	۶/۱۴ ^{ac}	Zarfam
۰/۶۰۹ ^{cd}	۱۳/۰۵ ^{bd}	۲۶/۶۶ ^{bc}	۰/۵۴ ^{ce}	۰/۰۶۷ ^{ce}	۰/۵۴ ^d	۰/۵۹ ^{bf}	۵/۴۱ ^{de}	Jewel
۰/۵۷۷ ^d	۱۲/۳۷ ^d	۲۶/۷۳ ^{bc}	۰/۴۸ ^{de}	۰/۰۵۴ ^e	۰/۵۲ ^d	۰/۵۳ ^{ef}	۴/۸۵ ^e	Hyola 60
۰/۷۴۵ ^{ad}	۱۴/۴۹ ^{bd}	۲۷/۵۹ ^{bc}	۰/۶۳ ^{bc}	۰/۰۷۲ ^{bc}	۰/۶۷ ^{ad}	۰/۶۵ ^{bf}	۶/۱۶ ^{ac}	Talaye
۰/۶۸۲ ^{bd}	۱۳/۷۲ ^{bd}	۲۷/۳ ^{bc}	۰/۵۶ ^{ce}	۰/۰۵۷ ^{de}	۰/۶۳ ^{ad}	۰/۶۳ ^{bf}	۷/۱۳ ^{ad}	Orient
۰/۸۳۴ ^{ac}	۱۶/۲۴ ^{ab}	۲۹/۰۲ ^{ab}	۰/۷۶ ^{ac}	۰/۰۸۱ ^{ad}	۰/۷۵ ^{ac}	۰/۷۸ ^{ac}	۸/۱۴ ^d	Hayola 308
۰/۷۰۳ ^{bd}	۱۵/۹۸ ^{ac}	۲۸/۷۴ ^{ac}	۰/۷۴ ^{ac}	۰/۰۷۸ ^{ad}	۰/۶۳ ^{ad}	۰/۷۹ ^{ab}	۷/۶۷ ^{ac}	Quantum

تفاوت حروف در هر ستون نشان دهنده اختلاف در سطح احتمال ۵ درصد می‌باشد



شکل ۱- گروه‌بندی ارقام مختلف کلزا بر اساس صفات فیزیولوژیک و مورفولوژیک به روش Ward (در سطوح: الف) شاهد، ب) شوری ۱۵۰ میلی‌مولار ج) شوری ۲۵۰ میلی‌مولار
Figure 1. Grouping of *Brassica napus* cultivars based on physiological and morphological traits using Ward method at levels of control (A), 150 mM (B) C) and 250 mM salinity

جدول ۵- میانگین، انحراف از میانگین کل، درصد انحراف از میانگین کل و انحراف استاندارد میانگین‌ها در ۳ خوشه حاصل از تجزیه خوشه‌ای برای صفات مورفوفیزیولوژیک ارقام کلزا در سطح شاهد
 Table 5. Mean, deviation from total mean, standard error of mean in three groups obtained from cluster analysis for morphophysiological traits of *Brassica napus* cultivars at contro l level

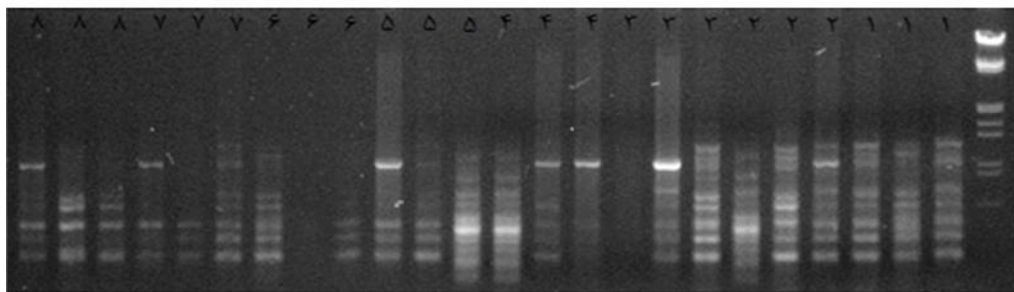
خوشه	رقم	وزن تر اندام هوایی (gr)	وزن تر ریشه (gr)	وزن خشک اندام هوایی (gr)	وزن خشک ریشه (gr)	حجم ریشه (cm ³)	طول ریشه (cm)	سطح ریشه	R/S	عملکرد بیولوژیک (gr)	کلروفیل (SPAD)	نسبت سدیم به پتاسیم	فلونورسانس کلروفیل	سدیم (ppm)	پتاسیم (ppm)	
۱	PF SLMO 46	میانگین	۱۲/۷۲	۱/۷۸	۱/۳۴	۱/۷۲	۳۶/۴۹	۲۷/۸۹	-/۱۴	۱/۵۳	۳۵/۶۸	-/۰۲۵	-/۸۲۸	-/۰۷۷۶	۳/۲۶	
		انحراف از میانگین	۲/۳۸	۰/۶۷	-/۳۵	۰/۰۷	۰/۶۵	۲/۲۶	۷/۰۸	-/۰۳	-/۴۴	۱/۴۷	۰/۰۰۱	۰/۰۰۴	-/۰۰۶	
		درصد انحراف از میانگین	۲۳/۰۲	۶۰/۳۶	۳۵/۲۵	۶۳/۶۳	۶۰/۷۵	۹/۸۱	۳۴/۰۲	۲۷/۲۷	۴۰/۳۷	۴/۲۹	۴/۱۷	۰/۴۹	-/۰۲۶	-/۱/۸۱
		انحراف استاندارد	۰/۴۸	۰/۰۰۹	-/۰۳۷	-/۰۰۰۹	-/۰۱	۱/۶۹	۰/۶۵	-/۰۰۴	-/۰۳۸	-/۶۵	-/۰۰۰۹	-/۰۰۴	۰/۰۰۰۵	۰/۲۲
۲	RGS Hyola 401 Licord Zarfam Jewel Quantum	میانگین	۹/۵۶	۱/۰۳	۰/۸۶	۰/۹۹	۳۲/۳۱	۱۹/۶۶	-/۱۲	-/۹۷	۳۴/۳۷	-/۰۲۲	-/۸۲۷	-/۰۷۷۷	۳/۶۷	
		انحراف از میانگین	-/۰۷۸	-/۰۰۸	-/۱۳	-/۰۰۷	-/۰۸	-/۰۸	-/۱۵	-/۰۱	-/۱۲	-/۱۶	-/۰۰۲	۰/۰۰۳	-/۰۳۵	
		درصد انحراف از میانگین	-۷/۵۴	-۷/۲۱	-۱۳/۱۳	-۶/۳۶	-۷/۴۸	-۵/۵۳	-/۲۵	۹/۰۹	-۱۱/۰۱	-/۴۷	-۸/۳۳	۰/۲۶	۰/۳۹	۱۰/۵۴
		انحراف استاندارد	۰/۵۵	۰/۰۷۸	-/۰۳۳	-/۰۰۷	-/۰۸۶	۰/۵۶	۰/۶۹	-/۰۱۲	-/۰۳	۱/۳۸	-/۰۰۰۷	-/۰۰۲	-/۰۰۱	۰/۰۹۴
۳	Hyola 60 Talaye Orient Hayola 308 SLMO 43 Okapia Adder	میانگین	۱۰/۳۲	۰/۹۸	۰/۹۹	-/۱	۳۳/۰۹	۱۹/۷۶	-/۱۰۲	۱/۰۹	۳۳/۶۵	-/۰۲۶	-/۸۲۱	-/۰۷۷۲	۳/۰۳	
		انحراف از میانگین	-/۰۲	-/۱۳	۰/۰۰۲	-/۰۱	-/۱۲	-/۱۴	-/۱۵	-/۰۰۸	-/۰۰۹	-/۵۶	۰/۰۰۲	-/۰۰۳	-/۰۲۹	
		درصد انحراف از میانگین	-/۱۹	-/۱۲	۰/۰۰۲	-/۰۰۹	-/۴۲	-/۲۱	-/۵	-۷/۲۷	-/۸۲	-/۶۴	۸/۳۳	-/۳۶	-/۰۲۶	-۸/۷۳
		انحراف استاندارد	۰/۶۵	۰/۷۸	۰/۴۶	-/۰۰۸	۰/۷۲	۰/۹۵	۰/۷۲	-/۰۰۷	-/۰۵	۰/۵۹	-/۰۰۰۳	۰/۰۰۲	۰/۰۰۰۸	۰/۰۴
میانگین کل		۱۰/۳۴	۱/۱۱	۰/۹۹	۰/۱۱	۳۳/۲۳	۲۰/۸۱	-/۱۱	۱/۰۹	۳۴/۲۱	-/۰۲۴	-/۸۲	-/۰۰۸	۳/۳۲		

جدول ۶- میانگین، انحراف از میانگین کل، درصد انحراف از میانگین کل و انحراف استاندارد میانگین‌ها در ۳ خوشه حاصل از تجزیه خوشه‌ای برای صفات مورفوفیزیولوژیک ارقام کلزا در سطح تنش ۱۵۰ میلی‌مولار
 Table 6. Mean, deviation from total mean, standard error of mean in three groups obtained from cluster analysis for morphophysiological traits of *Brassica napus* cultivars at 150 mM salinity stress

خوشه	رقم	وزن تر اندام هوایی (gr)	وزن تر ریشه (gr)	وزن خشک اندام هوایی (gr)	وزن خشک ریشه (gr)	حجم ریشه (cm ³)	طول ریشه (cm)	سطح ریشه	R/S	عملکرد بیولوژیک (gr)	کلروفیل (SPAD)	نسبت سدیم به پتاسیم	فلوئورسانس کلروفیل	سدیم (ppm)	پتاسیم (ppm)
۱	SLMO 43 Talaye SLMO 46 PF Hayola308	۷/۲۶	-/۸۱	-/۰۹	-/۰۸۶	۰/۷۲	۲۷/۴۲	۱۵/۵۴	-/۱۲۵	-/۰۷۷	۳۳/۲	۳/۳۸	-/۸۰۹	۳/۹۱	۱/۳۱
	انحراف از میانگین درصد	۰/۸۵	-/۱۲	-/۰۹	-/۰۱۶	۰/۱۳	-/۴۴	۱/۵۲	-/۰۰۸	۰/۱	۰	-/۱۱	-/۰۷	-/۰۲	
	انحراف از میانگین	۱۳/۲۶	۱۷/۳۹	۱۵	۲۲/۸۶	۲۲/۰۳	۱/۶۳	۱۰/۸۴	۶/۸۴	۱۴/۹۳	۰	-۳/۱۵	-/۰۴۹	-/۰۱۸	۱/۵۵
	انحراف استاندارد	۰/۳۴	-/۳۸	-/۰۱۴	-/۰۰۳	-/۰۴۳	-/۳۲	-/۵۱	-/۰۰۶	-/۰۲	۰/۸۸	۰/۲۸	۰/۰۰۴	-/۱۵	-/۰۹
۲	Okapia Jewel Hyola 60 Hyola401 Adder Licord	۵/۲۹	-/۵۵	-/۰۵	-/۰۵۶	۰/۴۷	۲۶/۷۳	۱۲/۴۳	-/۱۱۳	-/۰۵۶	۳۳/۹۱	۳/۱۷	-/۸۱۶	۳/۹۴	۱/۴۳
	انحراف از میانگین درصد	-/۱۲	-/۱۴	-/۱	-/۰۱۴	-/۱۲	-/۲۵	-/۵۹	-/۰۰۴	-/۱۱	۰/۷۱	-/۳۲	۰/۰۰۳	-/۰۴	-/۱۴
	انحراف از میانگین	-۱۷/۴۷	-۲۰/۲۹	-۱۶/۶۷	-۲۰	-۲۰/۳۴	-/۹۳	-۱۱/۳۴	-۳/۴۲	-۱۶/۴۲	۲/۱۴	-۹/۱۷	-/۳۷	-/۰۱	۱۰/۸۵
	انحراف استاندارد	۰/۱۹	-/۰۲۷	-/۰۱	-/۰۰۲	-/۰۲	-/۱۹	-/۱۸	-/۰۰۳	-/۰۱	۰/۷۵	۰/۲۸	۰/۰۰۲	۰/۹۷	-/۱۴
۳	Zarfam Orient RGS	۶/۹۶	-/۷۲	-/۶۳	-/۰۶۷	۰/۶۱	۲۶/۶۲	۱۴/۱۶	-/۱۰۷	-/۰۶۹	۳۳/۰۷	۴/۳۲	-/۸۱۷	۴/۲۴	۱/۰۶
	انحراف از میانگین درصد	۰/۵۵	-/۰۳	-/۰۳	-/۰۰۳	-/۰۲	-/۳۶	-/۱۴	-/۰۱	-/۰۲	-/۱۳	-/۸۳	۰/۰۰۴	-/۲۶	-/۲۳
	انحراف از میانگین	۸/۵۸	۴/۳۵	۵	-۴/۲۹	۳/۳۹	-/۳۳	۰/۹۹	-/۵۵	۲/۹۹	-/۴	۳۳/۷۸	-/۴۹	۶/۵۳	-۱۷/۸۳
	انحراف استاندارد	۰/۲۹	-/۰۴	-/۰۱۹	-/۰۰۳	-/۰۳	۱/۰۱	-/۱	-/۰۰۸	-/۰۲	۰/۶۱	۰/۲۸	۰/۰۰۸	-/۰۱	-/۰۶
میانگین کل		۶/۴۱	-/۶۹	۰/۶	-/۰۷	۰/۵۹	۱۹/۸۲۶	۱۴/۰۲	-/۱۱۷	۰/۶۷	۳۳/۲	۳/۴۹	۳/۹۸	۱/۲۹	

جدول ۷- میانگین، انحراف از میانگین کل، درصد انحراف از میانگین کل و انحراف استاندارد میانگین‌ها در ۳ خوشه حاصل از تجزیه خوشه‌ای برای صفات مورفوفیزیولوژیک ارقام کلزا در سطح تنش ۲۵۰ میلی مولار
 Table 7. Mean deviation from total mean, standard error of mean in three groups obtained from cluster analysis for morphophysiological traits of *Brassica napus* cultivars at 250 mM salinity stress stress

خوشه	رقم	وزن تر اندام هوایی (gr)	وزن تر ریشه (gr)	وزن خشک اندام هوایی (gr)	وزن خشک ریشه (gr)	حجم ریشه (cm ³)	طول ریشه (cm)	سطح ریشه	R/S	عملکرد بیولوژیک (gr)	کلروفیل (SPAD)	نسبت سدیم به پتاسیم	فلوئورسانس کلروفیل	سدیم (ppm)	پتاسیم (ppm)	
۱	Hyola 401 SLMO46 Zarfam PF Quantum SLMO 43 RGS	میانگین	۳/۳۲	۰/۳۵	۰/۳۸	۰/۳۷	۲۴/۰۹	۱۰/۳۶	۰/۱۰۹	۰/۴۲	۲۴/۱۰	۵/۷۳	۰/۷۶	۱۲/۵۹	۲/۲۹	
		انحراف از میانگین	-۰/۵۸	۰/۰۷	-۰/۰۵	-۰/۰۷	-۰/۰۷	-۰/۲۹	۱/۰۱	-۰/۰۰۳	-۰/۰۵	-۰/۰۱	-۱/۶۲	-۱/۲	-۰/۳۷	
		درصد انحراف از میانگین	۲۱/۱۷	۲۵	۱۵/۱۵	۲۰	۲۳/۳۳	۱/۲۲	۱۰/۸	۲/۸۳	۱۳/۵۱	-۰/۰۴	-۲۲/۰۴	۱/۳۳	-۸/۷	۱۹/۲۷
		انحراف استاندارد	-۰/۱۸	-۰/۰۲	-۰/۰۱	-۰/۰۱	-۰/۰۲	-۰/۴۶	-۰/۲۸	-۰/۰۰۶	-۰/۰۱	-۰/۷۰۲	-۰/۲۷	-۰/۰۰۹	-۰/۸۳	-۰/۱۲
۲	Orioint Hayola 308 Adder Talaye	میانگین	۲/۵۹	۰/۲۶	۰/۳۱	۰/۳۱	۲۳/۹۳	۹/۰۲	۰/۱۰۲	۰/۳۴	۲۴/۴۵	۷/۵۹	۰/۷۲	۱۱/۸	۱/۵۸	
		انحراف از میانگین	-۰/۱۵	-۰/۰۲	-۰/۰۲	-۰/۰۴	-۰/۰۱	-۰/۱۳	-۰/۳۳	-۰/۰۰۴	-۰/۰۳	-۰/۳۴	-۰/۲۴	-۰/۰۳	-۱/۹۹	-۰/۳۴
		درصد انحراف از میانگین	-۵/۴۷	-۷/۱۴	-۶/۰۶	-۱۱/۴۳	-۳/۳۳	-۰/۵۵	-۳/۵۳	-۳/۷۷	-۳/۷۷	-۸/۱	-۳/۲۷	-۴	-۱۴/۴۳	-۱۷/۷۱
		انحراف استاندارد	-۰/۲۷	-۰/۰۲	-۰/۰۲	-۰/۰۰۸	-۰/۰۲	-۰/۱۴	-۰/۳۱	-۰/۰۰۶	-۰/۰۱	-۰/۷۶	-۰/۴۸	-۰/۰۴	-۰/۹۴	-۰/۰۹
۳	Okapia Jewel Licord Hyola 60	میانگین	۱/۸۷	۰/۱۹	۰/۲۷	۰/۲۷	۲۳/۱۷	۷/۸۹	۰/۱۰۲	۰/۲۹	۲۳/۷۹	۸/۱۵	۰/۷۶	۱۵/۶	۱/۹	
		انحراف از میانگین	-۰/۸۷	-۰/۰۹	-۰/۰۶	-۰/۰۸	-۰/۰۸	-۰/۶۳	-۱/۴۶	-۰/۰۰۴	-۰/۰۸	-۰/۳۳	-۰/۸	-۰/۰۱	۱/۸۱	-۰/۰۲
		درصد انحراف از میانگین	-۳۱/۷۵	-۳۲/۱۴	-۱۸/۱۸	-۲۲/۸۶	-۲۶/۶۷	-۲/۶۵	-۱۵/۶۱	-۳/۷۷	-۳/۷۷	-۲۱/۶۲	-۱/۳۳	-۱۰/۸۸	۱۳/۱۳	-۱/۰۴
		انحراف استاندارد	-۰/۱۳	-۰/۰۲	-۰/۰۰۸	-۰/۰۰۲	-۰/۰۲	-۰/۸۱	-۰/۴۲	-۰/۰۰۵	-۰/۰۱	-۰/۲۸	-۰/۲۸	-۰/۰۱	-۰/۹۷	۰/۱
میانگین کل		۲/۷۴	۰/۲۸	۰/۳۳	۰/۳۵	۲۳/۸	۹/۳۵	۰/۱۰۶	۰/۳۷	۲۴/۱۱	۷/۳۵	۰/۷۵	۱۳/۷۹	۱/۹۲		



شکل ۲- الگوی نواریندی آغازگر شماره ۸ در برخی از ارقام کلزای مورد مطالعه (از هر رقم سه بوته مورد مطالعه قرار گرفته است و اولین ستون سمت راست سایز مارکر SM0191 می باشد)

Figure2. Banding pattern of primer 8 in some of *Brassica napus* studied cultivars (three plants from each cultivar were studied and the right column is the size marker SM0191)

جدول ۸- توالی، مقدار اطلاعات چند شکلی، شاخص نشانگری، شاخص شانون و تعداد نشانگرهای چندشکل تولید شده توسط آغازگرهای ISSR در ارقام مختلف کلزا

Table8. Sequences, polymorphic information, Shannon index, the number of polymorphic bands that produced by ISSR primers in *Brassica napus*

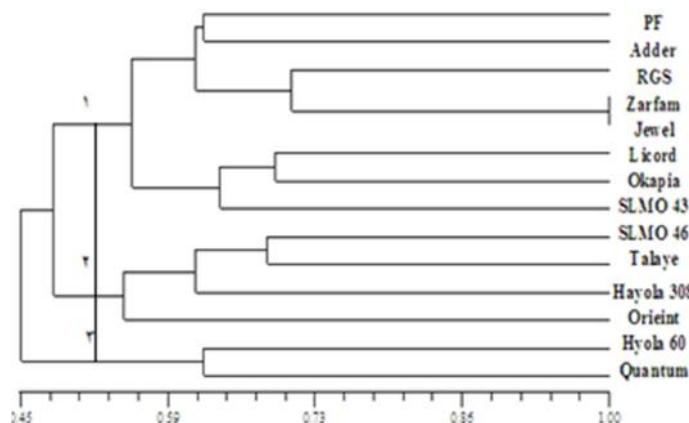
شماره نشانگر	توالی آغازگرها	PIC	MI	شاخص شانون	تعداد نوارهای چند شکل	درصد چند شکلی (%)
۱	5'-AGACAGACGC-3'	۰/۲۱۷	۱/۳۰۲	۰/۳۱۱	۶	۶۶/۶۶
۲	5'-GACAGACAGACAGACA-3'	۰/۲۴۳	۱/۴۵۸	۰/۳۴۹	۶	۷۵
۵	5'-AACAAACAACGG-3'	۰/۲۴۸	۱/۲۴	۰/۳۵۵	۵	۷۱/۴۳
۷	5'-GAGAGAGAGAGAGAGAT-3'	۰/۳۲۸	۰/۹۸۴	۰/۴۷	۳	۷۵
۸	5'-GACGACGACGACG-3'	۰/۲۸۱	۱/۹۶۷	۰/۴۰۳	۷	۷۷/۷۷
۱۱	5'-GTGGTGGTGGC-3'	۰/۳۰۲	۰/۶۰۴	۰/۴۳۲	۲	۴۰
۱۲	5'-TTGTTGTTGTTGTC-3'	۰/۳۱۷	۰/۹۵۱	۰/۴۵۵	۳	۶۰
۱۵	5'-ACGACGACGACGAC-3'	۰/۲۸۶	۰/۸۵۸	۰/۴۰۹	۳	۵۰
۱۶	5'-CACACACACAAG-3'	۰/۲۷	۰/۵۴	۰/۳۸۶	۲	۳۳/۳۳
۲۲	5'-ATGATGATGATGATGATG-3'	۰/۳۴۹	۰/۶۹۸	۰/۵	۲	۴۰
۳۱	5'-CACCACCACGC-3'	۰/۲۶۵	۱/۵۹	۰/۳۷۹	۶	۶۰

شباهت ژنتیکی بین ارقام Zarfam و Jewel (۰/۰۷۹) مشاهده شد. دامنه فواصل ژنتیکی بین ۰/۰۷۹ تا ۰/۳۲۴ متغیر بود.

به طور کلی نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که ارقام PF و SLMO46 از نظر اکثر صفات مورد مطالعه برتری داشتند. در حالیکه ارقام Hyola60 و Licord در اکثر صفات کمترین مقدار را دارا بودند. بالا بودن معیارهای شاخص نشانگری، شاخص شانون، تعداد و درصد نوارهای چندشکل برای آغازگر هشت نشان دهنده کارایی بالای این آغازگر در تمایز ارقام کلزای مورد مطالعه می باشد. ارقام Quantum و Hyola60 با SLMO46 بیشترین فاصله ژنتیکی را از یکدیگر دارا بودند. از این رو، می توان به عنوان والدین جهت ایجاد تنوع ژنتیکی در نسل های در حال تفکیک استفاده کرد.

در این تجزیه ۱۴ رقم مورد مطالعه به ۳ گروه تقسیم شدند. ارقام (Okapia, SLMO43, Licord, Jewel, Zarfam, RGS, Adder, PF) در گروه اول و ارقام (Hyola308, Talaye, SLMO46, Orient) در گروه دوم و ارقام Quantum و Hyola60 در گروه ۳ قرار گرفتند. نتایج گروه بندی بر اساس داده های مولکولی و مورفوفیزیولوژیکی در سطح تنش ۲۵۰ میلی مولار تا حدودی با هم همسویی داشتند. به طوری که در هر دو گروه بندی Zarfam, RGS و SLMO43 در گروه اول قرار گرفتند.

فاصله ژنتیکی بین لاین ها بر اساس فاصله ژنتیکی نی نیز (۳۲)، محاسبه شد. بیشترین فاصله ژنتیکی بین ارقام Quantum و SLMO46 (۰/۳۲۴) و ارقام Hyola60 و SLMO46 (۰/۳۲۳) و کمترین فاصله ژنتیکی یا بیشترین



شکل ۳- گروه‌بندی ارقام کلزا مورد مطالعه بر اساس داده‌های مولکولی (ISSR) با استفاده از روش دورترین همسایگی و ماتریس شباهت SM

Figure3. Grouping of studied *Brassica napus* cultivars based on molecular data (ISSR) using single linkage method and simple matching similarity matrix

منابع

1. Abdolzadeh, A. and N. Safari. 2002. Comparison of salt tolerance in eleven varieties of wheat with emphasize on ions accumulation. *Agricultural Sciences Natural Resources*, 9(2): 95-103 (In Persian).
2. Ahmadi, S.H. and J. Niazi Ardekani. 2006. The effect of water salinity on growth and physiological stages of eight Canola (*Brassica napus*) cultivars. *Irrigation Sciences*, 25(1): 11-20.
3. Akbari Ghogdi, E., A. Izadi darbandi, A. Borzooei and A. Majdabadi. 2011. Study of morphological changes in wheat genotypes under salt stress. *Science and Technology of Greenhouse Culture*, 4(1): 71-82 (In Persian).
4. Alizadeh, A. 2010. *Soil water plant relationship*. 3th edn. Imamreza University, Mashad, Iran, 484 pp.
5. Archangi, A., M. Khodambashi and A. Mohamadkhani. 2012. The effect of salt stress on morphological characteristics and Na⁺, K⁺ and Ca⁺ ion contents in medicinal plant fenugreek (*Trigonella foenum graecum* L.) under hydroponic culture. *Science and Technology of Greenhouse Culture*, 3(10): 33-41.
6. Ashraf, M., T. Mcneilly and A.D. Bradshaw. 1985. The Potential for evolution of salt (NaCl) tolerance in seven grass species. *New Phytologist*, 103(2): 299-309.
7. Ashraf, M. 2001. Relationships between growth and gas exchange characteristics in some salt-tolerant amphidiploids *Brassica* species in relation to their diploid parents. *Environmental and Experimental Botany*, 45(2): 155-163.
8. Ashraf, M. 2004. Some important physiological selection criteria for salt tolerance in plants. *ScienceDirect*, 199(5): 361-376.
9. Ashraf, M. and M.R. Foolad. 2005. Pre-sowing seed treatment-a shotgun approach to improve germination growth and crop yield under saline and none-saline conditions. *Advan. Agron*, 88: 223-271.
10. Ashraf, M. and Q. Ali. 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(3): 266-273.
11. Ashraf Mehrabi, A., M. Omidi and B. Fazeli Nasab, B. 2011. Effects of salinity on seed germination, seedling growth and callus culture of canola genotypes. *Journal of Field Crop Science*, 42(1): 81-90.
12. Azimi, M., M. Khodarahmi and M.R. Jalalkamali. 2012. Evaluation of some important agronomic characteristics in spring bread wheat genotypes under terminal drought stress and non-stress conditions. *Iranian Journal of Agronomy and Plant Breeding*, 8(1): 175-193 (In Persian).
13. Benlloch, M., M.A. Ojeda, J. Ramos and A. Rodriguesnavarro. 1994. Salt sensitivity and low discrimination between potassium and sodium in plants. *Plant and Soil*, 166(1): 117-123.
14. Blumwald, E., S.G. Aharon and M.P. Apse. 2000. Sodium Transport in Plant Cells. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1465(1-2): 140-151.
15. Bybordi, A and S.J. Tabatabaei. 2009. Effect of salinity stress on germination and seedling properties in canola cultivars (*Brassica napus* L.). *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 37(1): 71-76.
16. Bybordi, A. 2010. Effects of Salinity on Yield and Component Characters in Canola (*Brassica napus* L.) Cultivars. *Noulaet Scientia Biologicae*, 2(1): 81-83.
17. Chaves, M.M., J. Flexas and C. Pinheiro. 2009. Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell. *Annals of Botany*, 103(4): 551-560.

18. Davenport, R., R. James, A. Zakrisson, M. Tester and R. Munns. 2005. Control of sodium transport in durum wheat. *Plant Physiology*, 137(3): 807-818.
19. Dingkuhn, M., S.K. De Datta, R. Pamplona, C. Javellana and H.F. Schnier. 1992. Effect of late-season N fertilization on photosynthesis and yield of transplanted and direct-seeded tropical flooded rice. II. A canopy stratification study. *Field Crop Research*, 28(3): 235-249.
20. Esfandiari, E., F. Shekari, F. Shekari and M. Esfandiari. 2007. The effect of salt stress on antioxidant enzymes activity and lipid peroxidation on the wheat seedling. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj*, 35(1): 48-56.
21. Francois, L.E. 1994. Growth, seed yield and oil content of canola grown under saline conditions. *Agronomy Journal*, 86(2): 233-237.
22. Francis, D and D Piekielek. 2000. Assessing crop nitrogen needs with chlorophyllmeters. The site specific management guidelines series is published by the potash and phosphate institute (PPI). Coordinated by South Dakota State University (SDSU).
23. Jones, J.B. 2001. Laboratory guide for conduction soil tests and plant analysis. CRC press, LLC, U.S.
24. Kerepesi, H and G. Galiba. 2000. Osmotic and salt stress induced alteration in soluble carbohydrate content in wheat seedling. *Crop Science*, 40(2): 482-487.
25. Mahjoob, B., H. Najafi-Zarini and H.R. Hashemi. 2014. Assessment of genetic relationships among 36 Brassica genotypes using ISSR molecular markers. *Journal of Crop Breeding*, 6(14): 96-106 (In Persian).
26. Marschner, H. 1995. Mineral nutrition of higher plants. Academic Press. London.
27. Mohammad, M., H. Malkawi and R. Shibili. 2003. Effects of arbuscular mycorrhizal fungi and phosphorus fertilization on growth and nutrient uptake of barley grown on soils with different levels of salts. *Journal of plant Nutrition*, 26(1): 125-137.
28. Monirifar, H. 2016. Development and Evaluation of a Synthetic Alfalfa Variety for Tolerance to Salinity. *Journal of Crop Breeding*, 18(8):176-182 (In Persian).
29. Munns, R. 2002. Comparative physiology of salt and water stress. *Plant Cell Environment*, 25(2): 239-250.
30. Nagaoka, T. and Y. Ogihara. 1997. Applicability of inter-simple sequence repeats polymorphism in wheat for use as DNA markers in comparison to RFLP and RAPD markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 94(5): 597-602.
31. Nei, M. 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. *PNAS*, 70(12): 3321-3323.
32. Nei, M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*, 89(3): 583-590.
33. Nemati, M and A. Asghari. 2012. Evaluation of osmotic stress tolerance in hydroponics. *Journal of science and Technology of Greenhouse Culture*, 3(11): 19-30 (In Persian).
34. Nemati, M., A. Asghari, O. Sofalian, A. Rasoulzadeh and H.R. Mohamaddoust Chamanabad. Effect of Water Stress on Rapeseed Cultivars Using Morpho-Physiological Traits and Their Relations with ISSR Markers. 2012. *Journal of Plant Physiology and Breeding*, 2(1):55-66.
35. Penuelas, J., R. Isla, I. Filella and J.L. Araus. 1997. Visible and near-infrared reflectance assessment of salinity effects on barley. *Crop Science*, 37(1): 198-202.
36. Powell, W., M. Morgante and C. Andr. 1996. The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) marker for germplasm analysis. *Molecular Breeding*, 2(3): 225-238.
37. Prevost, A. and M.J. Wilkinson. 1999. A new system of comparing PCR primers applied to ISSR fingerprinting of potato cultivars. *Theoretical and Applied Genetics*, 98(1):107-112.
38. Rashid, A., R.H. Qureshi, P.A. Holington and R.G.W. Jones. 1999. Comparative responses of wheat cultivars to salinity at the seedling stage. *Crop Science*, 182(3): 199-207.
39. Reddy, M.P and A.B. Vora. 1986. Changes in pigments composition, hill reaction activity and saccharine metabolism in Bajra (*Pennisetum typhoides* S&H) leaves under NaCl salinity. *Photosynthetica*, 20: 50-55.
40. Roldan-Ruiz, F.A., T.J. Gilliland, P. Dubreuil, C. Dillmann and J. Lallemand. 2001. A comparative study of molecular and morphological methods of describing relationships between perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) varieties. *Theoretical and Applied Genetics*, 103(8): 1138-1150.
41. Saghai-Marouf, M.A., K.M. Soliman, R.A. Jorgensen and R.W. Allard. 1984. Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: Mendelian inheritance chromosomal location, population dynamics. *Proceeding of the National Academy of Sciences*, 81(24): 8014-8018.
42. Shiran, B., N. Amirbakhsh, S. Kiani, sh. Mohammadi, E. Sayed Tabatabaei and T. Moradi. 2007. Molecular characterization and genetic relationship among almond cultivars assessed by RAPD and SSR markers. *Scientia Horticulturae*, 111(5): 280-292.
43. Tarinejad, A., H. Gayomi, V. Rashidi, F. Farahvash and B. Alizade. 2012. Evaluation of Tolerance Rate of Canola Cultivar to Salinity Stress. *Sustainable Agriculture and Production Science*, 22(4.1): 29-43 (In Persian).
44. Tester, M. and R. Davenport. 2003. Na⁺ tolerance and Na⁺ transport in higher plants. *Annals of Botany*, 91(5): 503-527.
45. Zhu, J., M.D. Gale, S. Quarrie, M.T. Jackson and G.J. Bryan. 1998. AFLP markers for the study of rice biodiversity. *Theoretical and Applied Genetics*, 96(5): 602-611.
46. Zhu, J. 2003. Regulation of ion homeostasis under salt stress. *Current Opinion Plant Biology*, 6(5): 441-445.
47. Monirifar, H. 2016. Development and Evaluation of a Synthetic Alfalfa Variety for Tolerance to Salinity. *Journal of Crop Breeding*, 18(8):176-182 (In Persian).

Assesment of Salinity Tolerance in Some Canola Cultivars using Morphophysiologic Traits and ISSR Markers

Ali Asghari¹, Shiva Mohammadnia² and Hajar Fallahi³

1- Associate professor, Faculty of Agricultural Sciences, University of Mohaghegh Ardabil,
(Corresponding Author: ali_asgharii@yahoo.com)

2 and 3- PHD student and M.Sc. Graduated, Faculty of Agricultural Sciences, University of Mohaghegh Ardabil
Received: May 17, 2015 Accepted: December 13, 2016

Abstract

Canola (*Brassica napus* L.) is one of the most important world's oilseed crops. The salin soils and salinity is the most important environmental stress factor that affects production of rapeseed. In order to study salinity resistance in canola cultivars at seedling stage based on morphophysiological traits and assessing relation of these traits with ISSR markers, 15 canola cultivars in two salinity stress levels (150 mM and 250 mM) and non stress condition (control) were studied at greenhouse condition as hydroponic culture method. In this study, salinity stress caused decreasing of all evaluated morphophysiological traits, except Na to K ratio and Na content. Results of mean comparisons and classification by cluster analysis of cultivars in different conditions showed that the SLMO46 and PF were better than other cultivars in all traits, was superior for average of most traits. So, the Hyolla60 and Licord cultivars in all traits had lower amounts. In Molecular analysis using 11 ISSR primers, 45 polymorphic bands produced in studied canola cultivars. Means of Polymorphic Information Content and Marker Index for all primers were obtained 0.282 and 1.108, respectively. In cluster analysis using ISSR data and Nei's genetic distance and UPGMA method, the canola cultivars classified in three clusters. The minimum genetics distance obtained between Zarfam and Javel cultivars (0.079) and the maximum distance observed between Quantum and Hyolla60 whit SLMO46 cultivars (0.32).

Keywords: Canola, Molecular Markers, morphophysiological trait, salinity, Stres