

ORIGINAL ARTICLE

Study of Agronomic and Biochemical Traits of Doubled Haploid Camelina Lines under Rainfed Conditions in Kermanshah

Hossein Rostami-Ahmadvandi^{1*} , Danial Kahrizi², Mehdi Jamshid Moghaddam¹, Mehdi Geravandi¹

1. Associate Professor, Dryland Agricultural Research Institute, Sararood Branch, Agricultural Research, Education and Extension Organization, AREEO, Kermanshah, Iran.

2. Professor, Department of Biotechnology, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.

Correspondence:

Hossein Rostami-Ahmadvandi

Email: h.rostami83@gmail.com

Received: 27, Jan. 2025

Accepted: 14, Jan. 2026

How to cite:

Rostami-Ahmadvandi, H., Kahrizi, D., Jamshid Moghaddam, M., & Geravandi, M. (2025). Study of Agronomic and Biochemical Traits of Doubled Haploid Camelina Lines under Rainfed Conditions in Kermanshah. *Crop Biotechnology*, 15 (1), 1-10.

(DOI: [10.30473/cb.2026.73533.2002](https://doi.org/10.30473/cb.2026.73533.2002))

ABSTRACT

Camelina is recognize as a sustainable and environmentally friendly source for oil and biofuel production due to its adaptability to harsh climate cimditions. In this study, 134 pure double haploid lines of Camelina were evaluated in an augment experiment in terms of relevant agronomic and biochemical traits under dryland conditions. Seeds of each pure line were sown in an experimental unit and in four one-meter rows at the Dryland Agricultural Research Institute (DARI) Kermanshah, Iran. The measured traits included grain yield per unit area, plant height, days to flowering, days to maturity, thousand-seed weight, seed oil percentage, and other traits related to seed oil yield and quality. The results of the analysis of variance of morphological and phenological traits of this experiment showed that the studied lines had significant differences in all measured traits. The highest seed yield was 129.5, 110, 106 and 101 g/m² for lines DH82, DH 100, DH 72 and Soheil cultivar, respectively. The highest seed oil and protein content was 39.28 and 31.31 percent for lines DH 45 and DH 133, respectively, and the lowest was for lines DH 97 and DH 98, respectively. The average oil and protein content of the seeds across all lines was 36.57% and 28.53%, respectively.

KEYWORDS

Oil crops, Camelina, Oil quality.



«مقاله پژوهشی»

بررسی صفات زراعی و بیوشیمیایی لاین‌های هاپلوئید مضاعف‌شده کاملینا در شرایط دیم کرمانشاه

حسین رستمی احمدوندی^{۱*} , دانیال کهریزی^۲، مهدی جمشیدمقدم^۱، مهدی گراوندی^۱

چکیده

کاملینا به دلیل سازگاری با شرایط آب‌وهوایی سخت، به عنوان یک منبع پایدار و سازگار با محیط زیست برای تولید روغن و سوخت زیستی شناخته می‌شود. در این پژوهش تعداد ۱۳۴ لاین هاپلوئید مضاعف‌شده کاملینا به صورت آزمایش آگمنت از نظر صفات زراعی و بیوشیمیایی در شرایط دیم مورد ارزیابی قرار گرفتند. بذور هر لاین خالص در یک واحد آزمایشی و در چهار ردیف یک متری در معاونت موسسه تحقیقات کشاورزی دیم (کرمانشاه) کشت شدند. صفات مورد اندازه‌گیری شامل عملکرد دانه در واحد سطح، ارتفاع بوته، روز تا گل‌دهی، روز تا رسیدگی فیزیولوژیک، وزن هزاردانه، درصد روغن دانه و سایر صفات مرتبط با عملکرد و کیفیت روغن دانه بود. نتایج حاصل از تجزیه واریانس صفات مورفولوژیک و فنولوژیک این آزمایش نشان داد که لاین‌های مورد مطالعه از نظر تمامی صفات اندازه‌گیری شده دارای تفاوت معنی‌دار بودند. بیشترین عملکرد دانه با ۱۲۹/۵، ۱۱۰، ۱۰۶ و ۱۰۱ گرم بر مترمربع به ترتیب مربوط به لاین‌های شماره ۸۲، ۱۰۰، ۷۲ و رقم شاهد سهیل بود. بیشترین میزان روغن و پروتئین بذر با ۳۹/۲۸ و ۳۱/۳۱ درصد به ترتیب مربوط به لاین‌های ۴۵ و ۱۳۳ و کمترین مقدار به ترتیب مربوط به لاین‌های ۹۷ و ۹۸ بود. میانگین میزان روغن و پروتئین بذر تمامی لاین‌ها نیز به ترتیب برابر با ۳۶/۵۷ و ۲۸/۵۳ درصد بود.

واژه‌های کلیدی

دانه‌های روغنی، کاملینا، کیفیت روغن.

۱. استادیار، مؤسسه تحقیقات کشاورزی دیم کشور، معاونت سرارود، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرمانشاه، ایران.
۲. استاد، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران.

نویسنده مسئول:

حسین رستمی احمدوندی

رایانامه: h.rostami83@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۱۱/۰۸

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۱۰/۲۴

استناد به این مقاله:

رستمی احمدوندی، حسین؛ کهریزی، دانیال؛ جمشیدمقدم، مهدی و گراوندی، مهدی (۱۴۰۴). بررسی صفات زراعی و بیوشیمیایی لاین‌های هاپلوئید مضاعف‌شده کاملینا در شرایط دیم کرمانشاه، فصلنامه علمی زیست‌فناوری گیاهان زراعی، ۱۵ (۱)، ۱-۱۰.

(DOI: [10.30473/cb.2026.73533.2002](https://doi.org/10.30473/cb.2026.73533.2002))

مقدمه

بخش کشاورزی بزرگترین بخش مصرف کننده منابع آب زیرزمینی در کشور است. به دلیل استفاده از شیوه‌های منسوخ آبیاری و کاشت محصولات پرمصرف، بیش از ۷۰٪ آب مصرفی در بخش کشاورزی هدر رفته و تنها کمتر از ۳۰٪ مورد استفاده قرار می‌گیرد. از سوی دیگر بحران کم آبی در منطقه جنبه‌های مهم زندگی مردم بخصوص کشاورزان را تحت تاثیر قرار داده است. طبق پیش‌بینی‌های سازمان جهانی فائو تا سال ۲۰۳۰ چندین استان غربی ایران درگیر مسئله خشکسالی می‌شوند که استان کرمانشاه در راس آنها قرار دارد و این احتمال وجود دارد که میزان بارندگی‌های این استان تا ۳۰ درصد کاهش پیدا کند (Miri et al., 2011).

روغن‌های نباتی تولید شده به‌طور عمده از دانه‌های روغنی نظیر سویا، آفتابگردان، پنبه دانه، بادام زمینی و کلزا به دست می‌آید. امروزه صنعت روغن‌کشی و تولید روغن نباتی در اغلب کشورهای جهان جزو صنایع راهبردی محسوب می‌شود. در ایران نیز اراضی قابل کشت وسیع و زمینه‌های مساعدی برای کشت دانه‌های روغنی وجود دارد اما متأسفانه براساس آمارهای موجود هنوز بیش از ۸۵ درصد روغن مورد نیاز کشور از خارج تامین می‌شود (Ghamarnia et al., 2019).

با این وجود نیاز به محصولات روغنی جدید با سازگاری بیشتر و احتیاجات آبی کمتر به شدت احساس می‌شود چرا که گیاهان روغنی رایج مانند سویا، آفتابگردان و کلزا علی‌رغم مزیت‌های زیادی که دارند، دارای محدودیت‌هایی نیز هستند از قبیل سازگاری پایین با اقلیم‌های مختلف موجود در ایران، نیاز آبی و احتیاجات کودی نسبتاً بالا و حساسیت به انواع بیماری‌ها و آفات (Robinson, 1987).

در این میان گیاه دانه روغنی کاملینا با نام علمی *Camelina sativa* از خانواده براسیکاسه نظر به خصوصیات منحصر بفرد زراعی و تنوع در کاربردهای روغن استحصال شده از آن، یکی از گزینه‌های اصلی برای توسعه دانه‌های روغنی بخصوص در اراضی کم‌بازده و حاشیه‌ای به شمار می‌رود (Zanetti et al., 2021).

علاوه بر این، کاملینا مقاومت بسیار بالایی نسبت به آفات و بیماری‌هایی دارد که در سایر دانه‌های روغنی خسارات عمده‌ای به بار می‌آورند. پتانسیل تولید عملکرد بالا در گیاه کاملینا در شرایط مختلف احصا شده و امکان قرار گرفتن آن به عنوان گزینه مناسب در تناوب با غلات، مناسب گزارش شده است (Imbrea et al., 2011; McVay, 2008). این گیاه در سال‌های اخیر توجه زیادی را به خود جلب کرده است و مهمترین مزیت آن مقاومت فوق العاده آن به خشکی و سرمای بهاره است (Zanetti et al., 2024).

نقشه ژنوم گیاه کاملینا برای اولین بار توسط Gehringer et al. (2006) رسم گردید. پس از آن Singh et al. (2015) با استفاده از ۷۶۸ نشانگر SNP و روش Illumina GoldenGate SNP array نقشه ژنومی را توسعه دادند. Vollmann et al. (2005) آنالیز DNA به وسیله نشانگر RAPD برای بررسی تنوع کاملینای رشد یافته در سه میکرومحیط متفاوت در استرالیا انجام دادند و چهار گروه فنوتیپی را گزارش دادند. در این مطالعه تنها ۶۳٪ از ۳۰ نشانگر مورد بررسی پلی مورف بودند. این موضوع نشان دهنده تنوع کم گیاه خودگرد افشان کاملینا نسبت به گیاهانی است که با درصد بالایی از سیستم دگرگرده افشانی تولید مثل می‌کنند. یک محدودیت مهم در هر مطالعه بررسی تنوع ژنتیکی و فنوتیپی، اطمینان از تنوع کافی و سازگار با محیط زیست جغرافیایی مجموعه مورد نظر است. بسیاری از لاین‌های کاملینا تنوع کمی را در مقدار روغن و پروتئین و همچنین ترکیبات اسید چرب نشان می‌دهند. این موضوع برای ایجاد تنوع در کاملینا تحت شرایط زیست محیطی مختلف حائز اهمیت خواهد بود. ایجاد تنوع و بررسی آن برای کاملینا با توجه به برنامه‌های به‌نژادی برای ایجاد ویژگی‌های مثبت و بررسی آنها در مناطق مختلف امری ضروری است.

ایجاد گیاهان هاپلوئید مضاعف شده حاصل از کشت بساک یکی از روش‌های رایج و مناسب توسعه تنوع و اصلاح در گیاه کاملینا است (Vollmann & Eynck, 2015). جهت مفید واقع شدن روش هاپلوئیدی در

اصلاح گیاهان زراعی، هاپلوئیدها بایستی به‌صورت مؤثر و در دامنه وسیعی از گونه‌ها و ژنوتیپ‌ها تولید شوند (Dwivedi et al., 2015).

نتایج محققان نشان داده است که جنین‌زایی میکروسپورهای گیاهان جنس براسیکا وابسته به ژنوتیپ است و تنوع ژنتیکی بالایی در صفات جنین‌زایی برای ژنوتیپ‌های مختلف وجود دارد. در ایران، در ابتدای پروژه توسعه کاملینا، لاین DH1025 تولید شد که هم‌اکنون تحت عنوان رقم سهیل در سطح وسیع کشت می‌گردد (Kahrizi et al., 2015). ارزیابی تنوع ژنتیکی لاین‌های پیشرفته پر روغن کاملینا تحت شرایط دیم استان لرستان در سال ۱۴۰۲ انجام شده است و تنوع قابل ملاحظه‌ای بین لاین‌های هاپلوئید مضاعف شده مطالعه شده مشاهده شده است (Amiri et al., 2023). تنوع ژنتیکی این لاین‌های هاپلوئید مضاعف شده با نشانگرهای مولکولی نیز بررسی شده است. بعنوان مثال تنوع ژنتیکی در ۳۲ لاین هاپلوئید مضاعف شده کاملینا با استفاده از ۱۱ آغازگر ترکیبی REMAP مورد ارزیابی قرار گرفته است. هشت آغازگر نوارهای واضح و قابل امتیازدهی تولید کردند و در مجموع ۷۴ قطعه تولید گردید که ۵۹ قطعه (۷۹٪/۷۲) چندشکل بودند (Minaei Chenar et al., 2022).

نظر به هدف وزارت جهاد کشاورزی برای توسعه کشت کاملینا در تمام اقلیم‌های دیم کشور، ایجاد تنوع در این گیاه و معرفی ارقام جدید ضروری به نظر می‌رسد. برای اصلاح و ایجاد ارقام جدید داشتن اطلاعات تنوع ژنتیکی برای تولید محصول بالاتر، کیفیت بهتر و مقاوم به شرایط نامساعد لازم است. لاین‌های مورد مطالعه حاصل از کشت بساک نتاج تلاقی برخی ارقام تجاری کاملینا در اروپا بوده (Kahrizi et al., 2015) و با هدف ارزیابی صفات زراعی و بیوشیمیایی در شرایط دیم در کرمانشاه در این پژوهش کشت شده‌اند.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق تعداد ۱۳۴ لاین هاپلوئید مضاعف شده محصول دانه روغنی کاملینا به‌صورت آزمایش بدون تکرار (آگمنت) از نظر عملکرد دانه، صفات زراعی و برخی

خصوصیات بیوشیمیایی مرتبط تحت شرایط دیم شهرستان کرمانشاه مورد ارزیابی قرار گرفتند (لاین شماره ۳۷ به علت میزان بذر کم تولیدی حذف گردید). بذور هر لاین در یک واحد آزمایشی (بر مبنای یک گرم در متر مربع) و در چهار ردیف یک متری با فاصله ردیف ۲۵ سانتی‌متر در آذر ماه ۱۳۹۷ در مزرعه تحقیقاتی معاونت موسسه تحقیقات کشاورزی دیم کشور (ایستگاه سرارود) واقع در ۳۰ کیلومتری شرق کرمانشاه کشت شد. قبل از کاشت آماده‌سازی زمین با استفاده از چپزل و دیسک انجام و خطوط کاشت با استفاده از دستگاه هاسیا مشخص شدند. در این تحقیق از هیچ‌گونه کود اعم از زیستی و شیمیایی در مراحل مختلف رشد استفاده نشد. مبارزه با علف‌های هرز بین بلوک‌ها با استفاده از روتواتور باغی و داخل کرت‌ها با بعلت رقابت خوب کاملینا با علف‌های هرز، هیچگونه مبارزه مکانیکی یا شیمیایی انجام نشد. از رقم معرفی شده سهیل و نیز لاین‌های شماره ۸۲ و ۱۰۰ به عنوان شاهد در بلوک‌های مختلف به تناوب استفاده گردید. صفات مورد اندازه‌گیری شامل عملکرد دانه در واحد سطح، ارتفاع بوته، روز تا گلدهی، روز تا رسیدگی فیزیولوژیک، وزن هزار دانه، درصد روغن و سایر صفات مرتبط با عملکرد و کیفیت روغن دانه بود. تعیین پروفایل اسیدهای چرب دانه و تعیین درصد محتوی پروتئین دانه در دانشگاه رازی کرمانشاه انجام شد.

استخراج روغن و مشتق سازی آن

ابتدا بذور هر لاین بصورت جداگانه تمیز و بصورت دستی پودر شد. استخراج روغن از نیم گرم از نمونه‌های پودر شده بذر با استفاده از دستگاه سوکسله و هگزان نرمال به‌عنوان حلال و به مدت هشت ساعت، انجام شد. اسیدهای چرب آزاد موجود در روغن بعد از حذف حلال تحت شرایط خلأ صابونی شدند. سپس اسیدهای چرب به‌دست‌آمده با استفاده از روش Lepage & Roy (1984) متیلی شدند.

مشتق متیلی اسیدهای چرب، بعد از سرد شدن در دمای اتاق و حذف حلال برای بررسی به روش کروماتوگرافی گازی جدا شد و این استخراج برای هر نمونه سه بار تکرار شد.

تجزیه اسیدهای چرب آزاد به روش کروماتوگرافی

گازی

برای جداسازی و شناسایی انواع اسیدهای چرب، دستگاه کروماتوگرافی گازی (Varian CP3800) متصل به آشکارساز FID و مجهز به ستون سیلیکای قطبی (TR-CN100 poly[bicyanopropyl]siloxane) (طول ستون: ۶۰ متر، قطر داخلی: ۰/۲ میلی متر، ضخامت فیلم: ۰/۲ میکرومتر) (Teknokroma Co, Barcelona, Spain) مورد استفاده قرار گرفت. گاز حامل استفاده شده نیز گاز هلیوم با جریان ۱ میلی لیتر در دقیقه بود.

برنامه دمایی ستون با دمای ۱۷۵ درجه سانتی گراد به مدت ۲ دقیقه آغاز و سپس با افزایش دمای ۳ درجه در دقیقه ادامه یافت تا به دمای نهایی به ۲۳۰ درجه سانتی گراد رسید و به مدت ۳ دقیقه در همین دما باقی ماند. نسبت شکاف در اتاقک تزریق در این آزمایش ۲۵:۱ بود.

دمای اتاقک تزریق و آشکارساز ۲۹۰ درجه سانتی گراد و حجم عصاره برای تزریق ۱ میکرو لیتر بود. اجزای هر نمونه با استفاده از نرم افزار Workstation (V 6.4) تجزیه و مورد بررسی قرار گرفت. مقدار اسیدهای چرب بر اساس درصد روغن کل و با مقایسه سطح زیر قله آن‌ها با نمونه‌های استاندارد (C:12-C:24، شرکت سیگما) محاسبه شد.

تعیین درصد روغن و پروتئین

درصد محتوی روغن با استفاده از دستگاه NMR مدل آکسفورد در آزمایشگاه کیفیت روغن معاونت موسسه تحقیقات کشاورزی دیم به روش غیر تخریبی و روی ۲۰ گرم بذر کاملاً خالص و تمیز در داخل استوانه شیشه‌ای انجام شد. درصد پروتئین دانه به روش کلدال و از حاصل ضرب درصد نیتروژن در عدد ثابت ۶/۲۵ تعیین گردید. برای این منظور یک گرم از دانه پودر شده به روش خشک سوزانی در کوره الکتریکی خاکستر شده و پس از حل در اسید کلریدریک ۲ مولار غلظت نیتروژن به وسیله دستگاه جذب اتمی براساس روش Rathke & Diepenbrock (2005) اندازه گیری شد.

وضعیت بارندگی و دما در ایستگاه سرارود

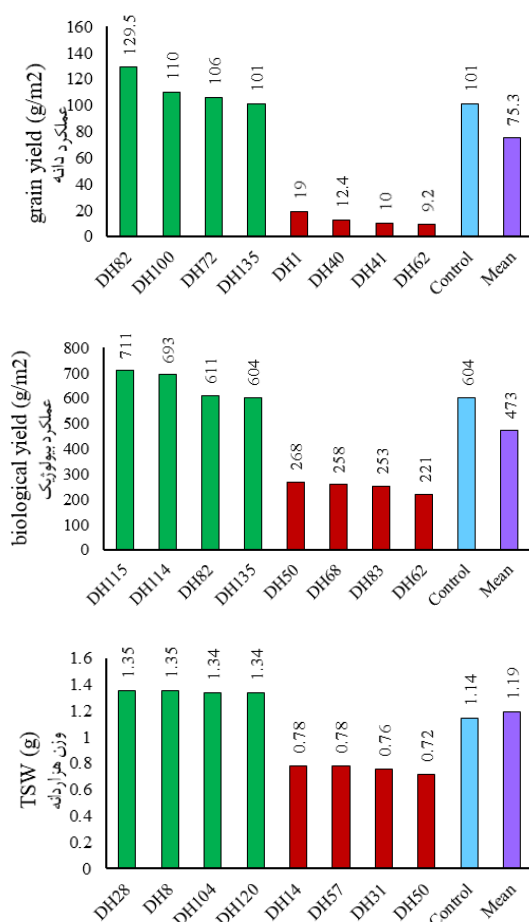
میزان مجموع بارندگی در محل انجام آزمایش (بر اساس داده‌های ایستگاه سینوپتیک سرارود) در سال زراعی ۹۸-۹۷ برابر با ۷۸۲/۵ میلی متر بود. پراکنش بارندگی در پاییز ۳۱۷/۷ در زمستان ۲۳۷/۳ و در بهار ۲۲۷/۵ میلی متر بوده است. به عبارت دیگر، ۴۰/۶۰ درصد بارش‌ها در پاییز ۳۰/۳۲ درصد در زمستان و ۲۹/۰۸ درصد در بهار بوقوع پیوسته است. داده‌های درجه حرارت نشان می‌دهند که متوسط دمای سال زراعی اخیر ۱۴/۱۱ درجه سانتی گراد و مجموع روزهای بارانی ۹۸ روز بوده است (جدول ۱).

جدول ۱. جدول اطلاعات هواشناسی ایستگاه سرارود- سال زراعی ۹۸-۱۳۹۷

Table 1. Meteorological information table for Sararood station 2018-2019

دمای میانگین Mean temp	تعداد روزهای بارانی Nubmer of rainy days	مجموع بارندگی Rainfall (mm)		
19.8	9	25.6	Sep.22-Oct.21	مهر
12.4	12	140	Oct.22-Nov.21	آبان
7.2	17	152.1	Nov.22-Des.20	آذر
2.7	9	56.4	Des.21-Jan.19	دی
4.2	10	117.1	Jan.20-Feb.18	بهمن
5.1	12	63.8	Feb.19-Mar.19	اسفند
9.6	20	208.5	Mar.20-Apr.19	فروردین
15.5	8	18.6	Apr.20-May.20	اردیبهشت
23.5	1	0.4	May.21-Jun.20	خرداد
26.9	0	0	Jun.21-Jul.21	تیر
28.4	0	0	Jul.22-Aug.21	مرداد
14.11	98	782.5		مجموع Total

نسبت به مطالعات پیشین باشد. اما با این وجود هم راحتی می‌توان با این ارتفاع نسبت به برداشت مکانیزه اقدام نمود.



شکل ۱. نمودار مقایسه برخی صفات زراعی لاین‌های مورد مطالعه کاملینا. چهار لاین دارای بیشترین مقدار هر صفت با رنگ سبز و چهار لاین دارای کمترین مقدار با رنگ قرمز نشان داده شده است.

Figure 1. Comparison of some agronomic traits of the studied Camelina lines. The four genotypes with the highest and lowest values of each trait are shown in green and red respectively.

ریزبودن اندازه بذر گیاه کاملینا یکی از مشکلات پیش روی توسعه کشت آن در حوزه به‌زراعی است چرا که استقرار آن را در خاک بخصوص در کشت وسیع و انجام عملیات مکانیزه با مشکل مواجه می‌کند. وزن هزاردانه ژنوتیپ‌های مختلف این گیاه حدود یک گرم است اما در سال‌های اخیر مطالعاتی برای افزایش اندازه بذر با روش‌های اصلاح کلاسیک، روش‌های بر پایه مهندسی

نتایج و بحث

صفات مورفولوژیک و فنولوژیک

نتایج حاصل از تجزیه واریانس صفات مورفولوژیک و فنولوژیک در این پژوهش تفاوت معنی‌دار بین لاین‌های مورد مطالعه از نظر تمامی صفات اندازه‌گیری شده را نشان داد. نتایج آزمون معنی‌داری به همراه آماره‌های میانگین، مقادیر حداقل و حداکثر صفات اندازه‌گیری شده و مقدار LSD برای هر صفت در جدول (۲) ارائه شده است.

به‌طور خلاصه نتایج مقایسه میانگین براساس صفات مورد بررسی نشان داد که بیشترین عملکرد دانه (بیشتر از یک تن در هکتار) با ۱۲۹/۵، ۱۱۰، ۱۰۶ و ۱۰۱ گرم بر متر مربع به ترتیب مربوط به لاین‌های ۸۲، ۱۰۰، ۷۲ و رقم شاهد سهیل (شماره ۱۳۵) بود (شکل ۱).

در اولین تجربه کاشت کاملینا در ایران در شرایط دیم استان کرمانشاه (سال زراعی ۹۱-۹۲ با میزان بارندگی ۸۱۲ میلی‌متر) و براساس نتایج حاصل از تجزیه واریانس گزارش شد که در دو زمان کشت مختلف، از نظر تمامی صفات اندازه‌گیری شده به غیر از تعداد بذر در غلاف، تعداد شاخه، تعداد غلاف در بوته، تعداد غلاف در شاخه، تعداد بذر در غلاف و ارتفاع گیاه تفاوت معنی‌دار وجود دارد. با توجه به اینکه تیمار در این مطالعه دو تاریخ کشت بود، بنابراین اختلاف معنی‌دار در جدول، بیانگر برتری مقادیر بیشتر صفت در تاریخ کشت مربوطه می‌باشد. بیشترین عملکرد مربوط به تاریخ کشت اول (۱۵ آبان) با ۲۱۷/۶۶۷ گرم در مترمربع و بیشترین بیوماس نیز مربوط به همین تاریخ کشت با ۵۱۴/۳۳۳ گرم در مترمربع بود (Kahrizi et al., 2015).

بیشترین مقدار وزن هزاردانه با ۱۳۵۱/۶۶ میلی‌گرم در لاین شماره ۲۸ مشاهده شد. لاین شماره ۷۸ با ۱۹۹ روز تا رسیدگی فیزیولوژیک و لاین شماره ۱ با ۱۸۵ روز تا رسیدگی به ترتیب دیررس‌ترین و زودرس‌ترین لاین‌ها بودند. بیشترین ارتفاع بوته (۸۶/۵ سانتی‌متر) مربوط لاین شماره ۱۲۳ بود و رقم شاهد سهیل ارتفاعی در حدود ۷۹ سانتی‌متر داشت. به‌نظر می‌رسد کشت دیر هنگام لاین‌ها (یکم آذرماه) و عدم زمان کافی برای رشد گیاه قبل از مرحله روزت دلیل ارتفاع پایین‌تر لاین‌ها

میزان درصد اسیدهای چرب در لاین‌های هاپلوئید مضاعف شده کاملینا در شرایط اقلیمی کرمانشاه در این پژوهش در جدول (۳) نشان داده شده است که مطابق انتظار بیشترین درصد اسیدهای چرب در پروفایل روغن این لاین‌ها را اسید لینولنیک با میانگین ۳۲/۸۸ درصد تشکیل می‌دهد. اسید لینولنیک با میانگین ۱۹/۹۱ و اسید اولئیک با میانگین ۱۵/۷۲ در میان همه لاین‌ها در رتبه‌های بعدی قرار داشتند. میانگین میزان اسیدهای چرب اشباع و غیر اشباع در این آزمایش به ترتیب ۱۱/۸۶ و ۸۹/۱۴ بود. این نتایج با بسیاری از مطالعات انجام شده روی پروفایل اسید چرب کاملینا مطابقت دارد و به طور کلی سه اسیدچرب نامبرده که از لحاظ ارزش غذایی و سلامت انسان نیز بسیار حائز اهمیت هستند، عمده‌ترین سهم را در پروفایل روغن استخراج شده از گیاه کاملینا دارند (Raziei et al., 2018).

عوامل مختلف محیطی و مدیریت زراعی علاوه بر خصوصیات ژنتیکی ویژگی‌های کمی و کیفی روغن را تحت تأثیر قرار می‌دهد. عواملی از قبیل شرایط اقلیمی، نوع رقم، روش کاشت، زمان برداشت محصول و روش فرآوری روغن خصوصیت نهایی روغن را تعیین می‌کند و این امکان را ایجاد می‌کند که محصول مشابه مربوط به مناطق جغرافیایی مختلف را از هم تشخیص داد. تاکنون تحقیقات متعددی در مورد تأثیر رقم و اثر شرایط اقلیم بر کیفیت روغن منتشر شده است (Salvador et al., 2001; Rakic & Johnson, 2024).

متوسط میزان استتاریک اسید نیز در میان لاین‌ها برابر با ۶/۲۶ درصد بود. این اسیدچرب معمولاً محبوب‌ترین اسیدچرب در میان اسیدهای چرب اشباع است زیرا تاکنون گزارشی از اثرات زیان بار آن منتشر نشده است (Vollmann & Eynck, 2015).

Zubr (1997) در مطالعه خود بر روی زراعت گیاه دانه روغنی کاملینا، گزارش کرد که بذر کاملینا شامل حدود ۳۷٪ روغن می‌باشد. همچنین گزارش نمود که حجم اسیدهای چرب غیر اشباع در روغن حدود ۹۰٪ می‌باشد و حدود ۵۰٪ از کل اسیدهای چرب چندانگانه اشباع نشده (polyunsaturated) لینولنیک اسید

ژنتیک و حتی پوشش دار کردن بذر صورت گرفته است که تا حدودی توانسته است وزن هزاردانه کاملینا را افزایش دهد (Cai et al., 2024; Bakhshandeh et al., 2024).

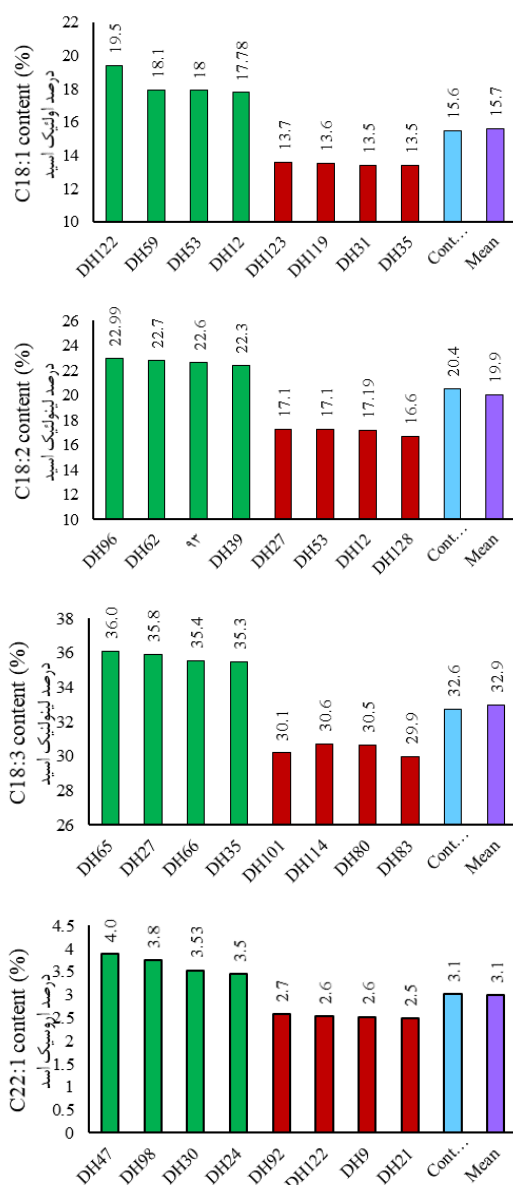
Kahrizi et al. (2015) در تاریخ کشت نیمه اول آبان ارتفاع بوته ۸۸ سانتی‌متری را برای لاین ۱۰۲۵ (معرفی شده در سال‌های بعد با نام رقم سهیل) گزارش کردند. در پژوهش Raziei et al. (2018) نتایج مقایسه میانگین اثرات اقلیم بر صفت ارتفاع بوته نشان داد که در شرایط دیم و زمان کاشت قبل از اولین بارندگی پاییزی و به صورت خشکه کاری در اقلیم‌های اردبیل (۱۰۱/۸۷ سانتی‌متر)، بوشهر (۱۰۱/۱۲ سانتی‌متر) و اهواز (۹۷/۱۹ سانتی‌متر) بالاترین ولی رشت (۷۵/۸۷ سانتی‌متر) و ایلام (۷۷/۲۶ سانتی‌متر) پایین‌ترین مقدار صفت ارتفاع بوته را نشان دادند.

صفات بیوشیمیایی

رقم و اقلیمی که محصول در آن رشد کرده است تأثیر مستقیمی روی کیفیت روغن تولیدی دارد به همین دلیل تولیدکنندگان برتر روغن امروزه برای معرفی روغن خود در بازار جهانی مشخصات رقم و محل تولید روغن را ذکر می‌کنند. در سال‌های اخیر تولید روغن حاصل رقم خاص، به دلیل ویژگی‌های کیفی آن در کشورهای تولید کننده گسترش یافته است (Zeinanlou et al., 2015).

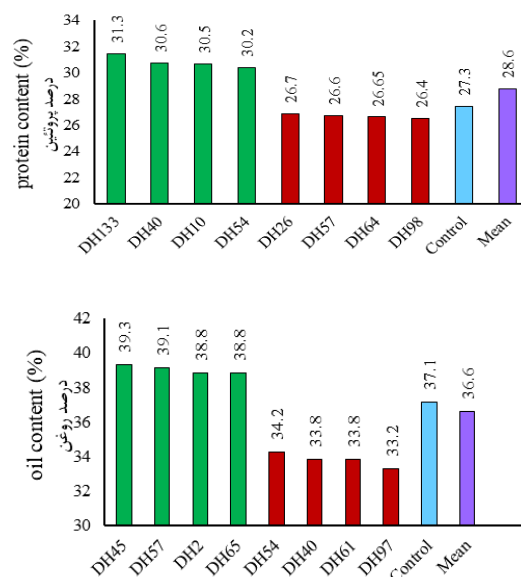
در این پژوهش بیشترین میزان روغن و پروتئین بذر مشاهده شده با ۳۹/۲۸ و ۳۱/۳۱ درصد به ترتیب مربوط به لاین‌های شماره ۴۵ و ۳۳ و کمترین مقدار به ترتیب مربوط به لاین‌های شماره ۹۷ و ۹۸ بود. میانگین میزان روغن و پروتئین بذر تمامی لاین‌ها نیز به ترتیب برابر با ۳۶/۵۷ و ۲۸/۵۳ بود (شکل ۲). براساس گزارش Toncea et al. (2013)، در اقلیم کشور رومانی محتوای بذر کاملینا عمدتاً شامل ۴/۲۵-۵/۲۴٪ خاکستر، ۱۱/۰۶-۱۵/۲۴٪ سلولز، ۸۷/۱۸-۹۷/۲۱٪ پروتئین، ۳۰/۱-۴۹/۷٪ چربی و ۲۱/۸۳-۲۸/۲۵ mg/100g ویتامین E و همچنین حدود ۱۸/۰٪ کلسیم، ۵۳/۰٪ فسفر، ۴۹/۰٪ مس، ۳۹/۱٪ منگنز، ۴۴/۴٪ آهن و ۲/۵۶٪ روی است.

محصول تاثیر منفی بر میزان روغن محصول و درصد اسیدهای چرب موجود در آن داشته باشد. سایر عملیات پس از برداشت محصول مانند نحوه استخراج روغن تاثیر چندانی بر تغییر پروفایل اسیدهای چرب ندارد (Mondor & Hernández-Álvarez, 2022).



شکل ۳. نمودار مقایسه درصد اسید چرب‌های مهم لاین‌های کاملینا. چهار لاین دارای بیشترین مقدار هر صفت با رنگ سبز و چهار لاین دارای کمترین مقدار با رنگ قرمز نشان داده شده است. **Figure 3.** Comparison of the percentage of important fatty acids in camelina lines. The four genotypes with the highest and lowest values of each trait are shown in green and red respectively.

(18:2n-6) و آلفا لینولنیک اسید (18:3n-3) می‌باشد. محتوای اروسیک اسید (22:1n-9) در این روغن حدود ۳٪ است.



شکل ۲. نمودار مقایسه درصد روغن و پروتئین بذر لاین‌های کاملینا. چهار لاین دارای بیشترین مقدار هر صفت با رنگ سبز و چهار لاین دارای کمترین مقدار با رنگ قرمز نشان داده شده است. **Figure 2.** Comparison of percentage oil and protein content of seeds of Camelina lines. The four genotypes with the highest and lowest values of each trait are shown in green and red respectively.

براساس جدیدترین مطالعه (Ebrahimi et al., 2025) روی لاین‌های هاپلوئید مضاعف شده کاملینا و ترکیب اسیدهای چرب روغن این گیاه، در مجموع ۱۰ درصد اسیدچرب اشباع مانند استئاریک اسید، ۳۵ درصد اسیدهای چرب غیر اشباع با یک پیوند دوگانه مانند اولئیک اسید و ۵۵ درصد اسیدهای چرب غیر اشباع با چند پیوند دوگانه (بیش از دو پیوند دوگانه) مانند لینولنیک اسید شناسایی شده‌اند که با نتایج این تحقیق مطابقت دارد.

تفاوت در میزان سهم هر یک از اسیدهای چرب در روغن کاملینا می‌تواند در پارامترهای مختلفی از جمله اقلیم باشد. همچنین عملیات زراعی انجام شده در طول رشد و نمو گیاه مانند کودهای مصرف شده نیز می‌تواند در این خصوص تعیین کننده باشد. به عنوان مثال استفاده از کود نیتروژنه به مقدار زیاد و برداشت دیر هنگام

توسعه کاملینا از جمله کشورهای اروپایی، کانادا و آمریکا صورت گرفته است که نتایج مثبتی نیز به دنبال داشته است.

تشکر و قدردانی

این تحقیق منتج از پروژه مصوب موسسه تحقیقات کشاورزی دیم کشور و مشترک با دانشگاه رازی کرمانشاه به شماره ۹۷۱۱۶۲-۰۷۹-۱۵۵۱-۱۵-۳ می‌باشد که بدین وسیله سپاسگزاری می‌شود. ضمناً از زحمات همکار مرحومه خانم مهندس سارا علیپور نیز در اجرا و ارزیابی لاین‌ها نسبت به بیماری تشکر کرده و برای روح ایشان طلب آمرزش داریم.

تعارض منافع

هیچ‌گونه تعارض منافع توسط نویسندگان وجود ندارد.

نتیجه‌گیری کلی و پیشنهادات

لاین‌های هاپلوئید مضاعف شده استفاده شده در این پژوهش از لحاظ اکثر صفات اندازه‌گیری شده اعم از زراعی و بیوشیمیایی تنوع نشان دادند. هرچند برای انجام اقدامات اصلاحی گسترده‌تر مانند تولید و معرفی لاین‌ها و ارقام دارای بذر درشت‌تر و یا دارای اروسیک اسید کمتر نیاز به تنوع بیشتری احساس می‌شود. با این وجود می‌توان برخی از لاین‌هایی را که در این آزمایش از لحاظ عملکرد دانه، پروتئین و روغن برتری نشان دادند (مانند لاین‌های ۴۵، ۳۳ و ۸۲) را برای مطالعات پیشرفته بعدی پیشنهاد داد. البته به‌طور کلی بر اساس گزارشات انتشار یافته و نظر به ماهیت خودگش بودن گیاه کاملینا، تنوع ژنتیکی زیادی در این گیاه قابل انتظار نیست لذا اقداماتی در حوزه اصلاح نباتات مولکولی و زیست‌فناوری از سالیان گذشته در کشورهای پیشرو در خصوص اصلاح و

منابع

- Agache, S., Bachelier, B., De Buyser, J., Henry, Y. & Snap, J.W. (1989). Genetic analysis of anther culture response in wheat using aneuploid, chromosome substitution and translocation lines. *Theoretical Applied Genetics*, 77, 7-11.
- Akk, E., & Ilumäe, E. (2005). Possibilities of growing *Camelina sativa* in ecological cultivation. *Estonian Research Institute of Agriculture*, Teaduse 13, 75501, Saku, Estonia.
- Amiri, R., Rostami Ahmadvandi, H., & Sayyahfar, M. (2023) Evaluation of Genetic Diversity in Advanced High-Oil *Camelina* Lines under Rainfed Conditions. *Journal of Crop Breeding*, 15(47), 152-164. (in Persian)
- Bakhshandeh, E., Abdellaoui, R., Hosseini Sanekhoori, F., Ghorbani, H., & Mirzaaghpour, N. (2024). Optimizing Seed Physiological Maturity and Quality in *Camelina* Through Plant Density Variation: A Nonlinear Regression Approach. *Agricultural Research*, 1-14.
- Cai, Y., Liang, Y., Shi, H., Cui, J., Prakash, S., Zhang, J., & Shanklin, J. (2024). Creating yellow seed *Camelina sativa* with enhanced oil accumulation by CRISPR-mediated disruption of Transparent Testa 8. *Plant Biotechnology Journal*, 22(10), 2773-2784.
- Dwivedi, S.L., Britt, A.B., Tripathi, L., Sharma, S., Upadhyaya, H.D. & Ortiz, R., (2015). Haploids: constraints and opportunities in plant breeding. *Biotechnology advances*, 33(6), 812-829.
- Ebrahimi, A., Chenar, H. M., Rashidi-Monfared, S., & Kahrizi, D. (2025). Enhancing Food Security via selecting Superior *Camelina* (*Camelina sativa* L.) parents: a positive approach incorporating pheno-morphological traits, fatty acids composition, and Tocopherols Content. *BMC Plant Biology*, 25(1), 53.
- Ferrie, A.M.R. & Bethune, T.D. (2011). Erratum to: A microspore embryogenesis protocol for *Camelina sativa*, a multi-use crop. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 107 (2), 371-371.
- Francki, M., Ghamkhar, K., Croser, J., Aryamanesh, N., Campbell, M., Kon'kova, N., & Francis, C. (2010). *Camelina* (*Camelina sativa* (L.) Crantz) as an alternative oilseed: molecular and ecogeographic analyses. *Genome*, 53(7), 558-567.
- Gehringer, A., Friedt, W., Luhs, W., & Snowdon, R. J. (2006). Genetic mapping of agronomic traits in false flax (*Camelina sativa* subsp. *sativa*). *Genome*, 49(12), 1555-1563 doi: 10.1139/g06-117.
- Ghamarnia, H., Kahrizi, D., & Rostami Ahmadvandi, H. (2019). *Camelina*, a low-input and adaptable plant. *Razi University Press*. (in Persian)

- Imbrea, F., Jurcoane, S., Halmajan, H., Duda, M., & Botos, L. (2011). Camelina sativa: A new source of vegetal oils. *Romanian Biotechnological Letters*, 16 (3), 6263-6270.
- Kahrizi, D., Rostami-Ahmadvandi, H., & Akbarabadi, A. (2015). Feasibility Cultivation of Camelina (*Camelina sativa*) as Medicinal-Oil Plant in Rainfed Conditions in Kermanshah-Iran's First Report. *Journal of Medicinal Plants and By-products*, 2, 215-218.
- Lepage, G., & Roy, C.C. (1984). Improved recovery of fatty acid through direct transesterification without prior extraction or purification. *Journal of Lipid research*, 25(12), 1391-1396.
- McVay, K.A. (2008). Camelina Production in Montana, MT200701AG Revised.
- Minaei Chenar, H., Rashidi Monfared, S., Kahrizi, D., Zarei, L., & Ebrahimi, A. (2022). Evaluation of genetic variation in doubled haploid lines of Camelina using REMAP retrotransposon markers. *Genetic Engineering and Biosafety Journal*, 11 (2), 6. (in Persian)
- Miri, A., Jafarizadeh, M., & Ghamarnia, H. (2011). Drought and its impact on groundwater resources using SPI index (case study of Kermanshah, Sahneh and Sonqor counties), *First National Congress of Modern Agricultural Sciences and Technologies*, Zanjan, University of Zanjan. (in Persian).
- Mondor, M., & Hernández-Álvarez, A. J. (2022). Camelina sativa composition, attributes, and applications: A review. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 124(3), 2100035.
- Rakic, Z., & Johnson, C. B. (2024). Influence of environmental factors (including UV-B radiation) on the composition of the essential oil of *Ocimum basilicum*—sweet basil. In *Breeding Research on Aromatic and Medicinal Plants* (pp. 157-162). CRC Press.
- Rathke, G.W.O., & Diepenbrock, W. (2005). Effect of nitrogen source and rate on productivity and quality of winter oilseed rape (*Brassica napus* L.) grown in different crop rotation. *Field Crops Research*, 94(2-3), 103-113.
- Raziei, Z., Kahrizi, D. & Rostami-Ahmadvandi, H., (2018). Effects of climate on fatty acid profile in Camelina sativa. *Cellular and molecular biology (Noisy-le-Grand, France)*, 64(5), 91-96.
- Robinson, R.G. (1987). Camelina: a useful research crop and a potential oilseed crop. Agricultural Experiment Station, University of Minnesota.
- Salvador, M.D., Aranda, F., Gómez-Alonso, S. & Fregapane, G. (2001). Cornicabra virgin olive oil: a study of five crop seasons. Composition, quality and oxidative stability. *Food Chemistry*, 74, 267-274.
- Samadi, M. (2013). Importance and improvement of Camelina. *Internal newsletter of Oilseeds Cultivation Development Company*. Issue 28. (in Persian)
- Singh, R., Bollina, V., Higgins. E. E., Clarke. W. E., Eynck. C., Sidebottom. C., Gugel, R., Snowdon, R., & Parkin, I. A., (2015). Single nucleotide polymorphism identification and genotyping in *Camelina sativa*. *Molecular Breeding*, 35, 1-13.
- Toncea, I., Necseriu, D., Prisecaru, T., Balint, L., Ghilvacs, G., & Popa, M. (2013). The seed's and oil composition of Camelia—first Romanian cultivar of camelina (*Camelina sativa* L. Crantz). *Romanian Biotechnological Letters*, 18 (5).
- Vollmann, J., & Eynck, C., (2015). Camelina as a sustainable oilseed crop: Contributions of plant breeding and genetic engineering. *Biotechnology Journal*, 10, 525-535.
- Vollmann, J., Gausgruber, H., Stift, G., Dryzhyruk, V., & Lelley, T. (2005). Genetic diversity in camelina germplasm as revealed by seed quality characteristics and RAPD polymorphism. *Plant Breeding*, 124, 446-453.
- Zanetti, F., Alberghini, B., Marjanović Jeromela, A., Grahovac, N., Rajković, D., Kiproviski, B., & Monti, A. (2021). Camelina, an ancient oilseed crop actively contributing to the rural renaissance in Europe. A review. *Agronomy for Sustainable Development*, 41, 1-18.
- Zanetti, F., Peroni, P., Pagani, E., von Cossel, M., Greiner, B. E., Krzyżaniak, M., & Monti, A. (2024). The opportunities and potential of camelina in marginal land in Europe. *Industrial Crops and Products*, 211, 118224.
- Zeinanlou, A., Arji, A., Taslímpour, M.R., Ramezani Malekroudi, M., & Azimi, M. (2015). The effect of cultivar and climatic conditions on the fatty acid composition of olive oil. *Iranian Horticultural Sciences*, 46(2), 233-242. (in Persian)
- Zubr, J. (1997). Oil-seed crop: Camelina sativa. *Industrial Crops and Products*, 6, 113-119.

Comparative Analysis of Nodulation and Gene Expression in Different Chickpea Genotypes Following Inoculation with *Mesorhizobium ciceri*

Shabnam Kokei¹, Bahman Bahramnejad^{2*} , Ghader Mirzaghaderi³

1. Ph.D. Student, Agriculture biotechnology, Faculty of Agriculture, University of Kurdistan, Sanandaj, Iran.

2. Associate Professor, Faculty of Agriculture, University of Kurdistan, Sanandaj, Iran.

3. Professor, Faculty of Agriculture, University of Kurdistan, Sanandaj, Iran.

Correspondence:

Bahman Bahramnejad

Email: b.bahramnejad@uok.ac.ir

Received: 16, Apr. 2025

Accepted: 19, Nov. 2025

How to cite:

Kokei, Sh., Bahramnejad, B., & Mirzaghaderi, Gh. (2025). Comparative Analysis of Nodulation and Gene Expression in Different Chickpea Genotypes Following Inoculation with *Mesorhizobium ciceri*. *Crop Biotechnology*, 15 (1), 11-27.

(DOI: [10.30473/cb.2025.74301.2007](https://doi.org/10.30473/cb.2025.74301.2007))

ABSTRACT

In this study, nodulation capacity and physiological traits were evaluated in ten chickpea (*Cicer arietinum*) genotypes following inoculation with *Mesorhizobium ciceri*. After comparing traits such as nodule number, nodule weight, total fresh weight, total dry weight, stem dry weight, root dry weight, stem length, and root length, two genotypes (Bionij and Pirooz) were selected for further investigation as the most and least efficient in symbiosis, respectively. Flavonoids play a crucial role as initial signaling molecules in the symbiotic interaction between legumes and nitrogen-fixing bacteria. Subsequently, the quantitative expression of the *Isoflavone 4'-O-methyltransferase* gene, involved in the isoflavonoid biosynthesis pathway, was assessed in the two chickpea genotypes (Bionij and Pirooz) at three time points post-inoculation (36 hours, 10 days, and 28 days) using Real-Time PCR. The results indicated a significant upregulation of this gene in both genotypes, particularly at 36 hours post-inoculation. This increase was more pronounced in the Bionij genotype. Leaf chlorophyll content and nitrogen levels in nodules and roots were measured in both treated and control plants. Data revealed that treated plants exhibited significantly higher levels of chlorophyll and nitrogen, with Bionij outperforming Pirooz in both parameters. These findings suggest that higher expression of this gene may be associated with enhanced nodulation capacity, improved symbiosis, and increased nitrogen uptake in chickpea.

KEYWORDS

Cicer arietinum L, Gene Expression, Isoflavonoid, *Mesorhizobium ciceri*, Nodulation, Symbiosis.



«مقاله پژوهشی»

بررسی مقایسه‌ای گره‌زایی و بیان ژن در ژنوتیپ‌های مختلف نخود پس از تلقیح با *Mesorhizobium ciceri*

شبنم کوکه‌ای^۱، بهمن بهرام‌نژاد^{۲*} , قادر میرزاقدری^۳

چکیده

در این پژوهش، توان گره‌زایی و صفات فیزیولوژیکی در ده رقم نخود (*Cicer arietinum*) پس از تلقیح با باکتری *Mesorhizobium ciceri* مورد ارزیابی قرار گرفت. پس از مقایسه‌ی شاخص‌هایی مانند تعداد گره، وزن گره، وزن تر کل گیاه، وزن خشک - ک کل گیاه، وزن خشک س - لاقه، وزن خشک ریشه، طول ساقه، طول ریشه، دو رقم بیونیج و پیروز، به‌ترتیب به‌عنوان ژنوتیپ‌های با همزیستی قوی‌تر و ضعیف‌تر، برای بررسی‌های دقیق‌تر انتخاب شدند. فلاونوئیدها به‌عنوان مولکول‌های سیگنالی اولیه در فرآیند همزیستی لگوم‌ها با باکتری‌های تثبیت‌کننده نیتروژن نقش مهمی ایفا می‌کنند. در ادامه‌ی این پژوهش، بیان کمی ژن *Isoflavone 4'-O-methyltransferase* که در مسیر سنتز ایزوفلاونوئیدها نقش دارد، در دو رقم نخود (بیونیج و پیروز) در سه زمان مختلف پس از تلقیح (۳۶ ساعت، ۱۰ روز، و ۲۸ روز) با روش Real-Time PCR ارزیابی شد. نتایج نشان داد که بیان این ژن در هر دو رقم، به‌ویژه در مرحله ۳۶ ساعت پس از تلقیح، به‌طور معنی‌داری افزایش یافته است. این افزایش بیان ژن در رقم بیونیج چشم‌گیرتر بود. میزان کلروفیل برگ و نیتروژن گره و ریشه در هر دو گیاه شاهد و تیمار اندازه‌گیری شد. داده‌ها نشان دادند که در گیاهان تیمار شده، میزان کلروفیل و نیتروژن به‌طور چشمگیری بالاتر از شاهد بود و رقم بیونیج، مقدار نیتروژن و کلروفیل بیش‌تری را نسبت به پیروز داشت. این یافته‌ها نشان می‌دهند که بیان بیشتر ژن مذکور می‌تواند با افزایش توان گره‌زایی، بهبود همزیستی و جذب نیتروژن در نخود مرتبط باشد.

واژه‌های کلیدی

Cicer arietinum L., *Mesorhizobium ciceri*, ایزوفلاونوئید، بیان ژن، گره‌زایی، همزیستی

۱. دانشجوی دکتری، بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده کشاورزی دانشگاه کردستان، سنندج، ایران.
۲. دانشیار، گروه ژنتیک و به‌نژادی دانشکده کشاورزی، دانشگاه کردستان، سنندج، ایران.
۳. استاد، گروه ژنتیک و به‌نژادی دانشکده کشاورزی، دانشگاه کردستان، سنندج، ایران.

نویسنده مسئول:

بهمن بهرام‌نژاد

رایانامه: b.bahramnejad@uok.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۰۱/۲۷

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۸/۲۸

استناد به این مقاله:

کوک‌های، شبنم؛ بهرام‌نژاد، بهمن و میرزاقدری، قادر (۱۴۰۴). بررسی مقایسه‌ای گره‌زایی و بیان ژن در ژنوتیپ‌های مختلف نخود پس از تلقیح با *Mesorhizobium ciceri*. فصلنامه علمی زیست‌فناوری گیاهان زراعی، ۱۵ (۱)، ۱۱-۲۷.
(DOI: [10.30473/cb.2025.74301.2007](https://doi.org/10.30473/cb.2025.74301.2007))

می باشد تا ارتباط بین بیان این ژن و توانایی گره‌زایی مورد ارزیابی قرار گیرد. این پژوهش سعی دارد با ترکیب داده‌های فیزیولوژیکی و مولکولی، درک عمیق‌تری از تعامل همزیستی در نخود ارائه دهد و به شناسایی ژنوتیپ‌های برتر در نخود کمک کند.

پیشینه پژوهش

تولید و سودآوری محصول نخود هر ساله توسط طیف وسیعی از بیماری‌های ریشه، از جمله پوسیدگی ریشه فیتوفترا (PRR؛ ناشی از *Phytophthora medicaginis*) و پژمردگی فوزاریوم (FW، ناشی از *Fusarium oxysporum f.sp.ciceris*)، محدود گشته و کاهش پیدا می‌کند. اگرچه اصلاح ارقام مقاوم، یکی از راهکارهای مهم برای مقابله با این بیماری‌ها می‌باشد، اما پژوهش‌ها نشان داده‌اند که گره‌زایی و تثبیت نیتروژن در نخود به‌شدت تحت تأثیر ژنوتیپ گیاه قرار دارد (Ferguson et al., 2019). این تفاوت‌ها می‌تواند ناشی از افزایش فرآیندهای دفاعی عمومی گونه‌های نسبتاً مقاوم باشد که به‌طور ناخواسته، همزیستی متقابل را نیز به‌خطر می‌اندازد (Plett et al., 2016). در مطالعه‌ای، بررسی ۲۹ ژنوتیپ مختلف نخود نشان داد که تعداد گره‌ها و عملکرد تثبیت نیتروژن بین ژنوتیپ‌ها تفاوت معنی‌داری از خود نشان می‌دهند برای مثال، ارقامی مانند Yorker و Moti گره‌زایی بسیار بیشتری نسبت به ژنوتیپی مانند PBA HatTrick داشتند. جالب آن‌که این تفاوت‌ها همواره با سطح مقاومت به بیماری‌های ریشه هم‌بستگی نداشتند. بنابراین بررسی عملکرد همزیستی رایزوبیومی در ژنوتیپ‌های مختلف نخود، به‌ویژه آن‌هایی که توان بالاتری در گره‌زایی دارند، برای اصلاح ارقام برتر اهمیت زیادی داشته و نیاز به بررسی بیشتر دارند (Plett et al., 2021).

تا همین اواخر، ابزارهای ژنتیکی کافی جهت درک مولکولی گره‌زایی در نخود، در دسترس نبود، اما انتشار ژنوم کامل و توالی‌یابی مجدد ۲۹ ژنوم نخود، توانست شناسایی ژن‌های مرتبط با گره‌زایی را تسهیل کند و به درک چگونگی تعامل ژن‌ها در مسیرهای مقاومت به بیماری، درک نیتروژن و انتقال کمک نماید (Roorkiwal et al., 2020). مراحل

مقدمه

نخود (*Cicer arietinum* L.) یکی از مهم‌ترین حبوبات غذایی جهان است و به‌عنوان منبع پروتئین در تغذیه انسان و همچنین خوراک دام، مورد استفاده قرار می‌گیرد. نخود شامل دو نوع دسی و کابلی می‌باشد. نوع دسی به صورت دانه‌های نسبتاً کوچک زاویه‌دار با رنگ‌های متنوع و گاهی خال‌دار می‌باشد در حالی که نوع کابلی، دارای دانه‌هایی با اندازه بزرگتر، صاف‌تر و رنگ روشن‌تر هستند (Merga & Haji, 2019).

نخود از نظر سطح زیرکشت، همواره جزو سه حبوبات اول جهان محسوب می‌شود و در سطحی بالغ بر ۱۱ میلیون هکتار کشت می‌گردد (Yadav et al., 2007). علیرغم تشکیل رابطه‌ی همزیستی عملکردی بین نخود و گو نه‌ی *Mesorhizobium ciceri*، تثبیت نیتروژن در این گیاه، نسبت به سایر حبوبات محدود است. مطالعات نشان می‌دهد که همزیستی بین نخود و *M. ciceri* فقط نیتروژن مورد نیاز و کافی را جهت افزایش رشد گیاه تثبیت می‌نماید، و تأثیری بر غلظت نیتروژن خاک پس از برداشت ندارد و باعث افزایش غلظت نیتروژن در خاک نمی‌گردد (Gan et al., 2010). همچنین، فاکتورهایی نظیر رقابت بین سویه‌های رایزوبیوم، رطوبت، pH و کیفیت خاک می‌توانند بر این همزیستی تأثیر بگذارند (Greenlon et al., 2019). بنابراین، درک بهتر عواملی که می‌توانند کیفیت و بهره‌وری این ارتباط همزیستی را افزایش دهند، برای کشاورزی پایدار اهمیت فراوانی دارد. در میان عوامل موثر، ژنوتیپ گیاه نقش تعیین‌کننده‌ای در گره‌زایی و تثبیت نیتروژن دارد. درک تأثیر ژنوتیپ بر گره‌زایی و تثبیت نیتروژن در گیاه نخود برای به حداکثر رساندن بهره‌ی تثبیت نیتروژن و کاهش مصرف کودهای نیتروژنی حائز اهمیت است. متأسفانه، پژوهش‌های محدودی به مقایسه چندین ژنوتیپ نخود در مقیاس وسیع پرداخته‌اند (Dwivedi et al., 2015).

هدف اصلی این مطالعه، مقایسه سیستماتیک ۱۰ ژنوتیپ نخود از نظر ظرفیت گره‌زایی پس از تلقیح با *Mesorhizobium ciceri*، بررسی بیان ژن *Isoflavone 4'-O-methyltransferase* به عنوان یکی از ژن‌های مهم دخیل در مسیر همزیستی، به طور خاص در دو رقم منتخب،

متیونین (SAM) به گروه هیدروکسی در موقعیت ۴ مولکول‌های ایزوفلاون‌ها را برعهده دارد. این واکنش، یک مرحله‌ی مهم در بیوسنتز ایزوفلاوونوئیدهای متیله شده، مانند ۴-متیوکسی ایزوفلاون‌ها (که در برخی گیاهان مانند نخود یافت می‌شوند)، است (Deavours et al., 2006). آنزیم I4'OMT دارای وزن مولکولی ۳۰ تا ۵۰ کیلو دالتون است. این آنزیم نقش مهمی در متیلاسیون ایزوفلاوونوئیدهای کلیدی مانند daidzein و genistein دارد، که این ترکیبات متیله شده به‌عنوان سیگنال‌های شیمیایی در جذب و تحریک باکتری‌های رایزوبیوم عمل می‌کنند. با ترشح این ایزوفلاوونوئیدها توسط ریشه‌های نخود، رایزوبیوم به سمت ریشه هدایت شده و باعث رشد و تکامل گره‌های ریشه‌ای می‌شود که برای تثبیت نیتروژن ضروری هستند (Silva et al., 2024). این همزیستی باعث می‌شود که گیاه نخود نیاز کمتری به استفاده از کودهای نیتروژنی سنتتیک داشته باشد. بهبود و افزایش بیان ژن I4'OMT می‌تواند باعث افزایش همزیستی موفق‌تر گیاه لگوم با رایزوبیوم، بهبود مقابله گیاه با بیماری‌ها و استرس‌های محیطی و افزایش تثبیت نیتروژن شود که در نهایت به ارتقاء عملکرد و کیفیت محصول کشاورزی می‌انجامد.

در این تحقیق، به منظور بررسی نقش ژنوتیپ نخود در تعامل با رایزوبیوم تلقیح شده و افزایش عملکرد همزیستی، ۱۰ رقم نخود تحت شرایط کنترل شده مورد مطالعه قرار گرفتند. ابتدا تأثیر ژنوتیپ‌ها بر صفات فیزیولوژیکی گیاه بررسی شد و سپس بهترین و ضعیف‌ترین رقم از نظر همزیستی با *Mesorhizobium ciceri* انتخاب و نقش بیان ژن I4'OMT و تثبیت نیتروژن در آن‌ها مورد ارزیابی دقیق‌تر قرار گرفت.

روش‌شناسی پژوهش

مطالعه بیوانفورماتیکی ژن I4'OMT در نخود

شماره دسترسی ژن I4'OMT و توالی آمینواسیدی آن در گیاه نخود با استفاده از پایگاه داده NCBI به دست آمد.

اولیه تشکیل گره در حبوبات مدل مانند *Medicago truncatula* و *Lotus japonicus* به‌خوبی مورد مطالعه قرار گرفته است (Nandety et al., 2023). در این سیستم‌ها، مدل کلی بدین صورت است که با درک رایزوبیا، متابولیت‌های ثانویه گیاهی (ترکیبات فلاوونوئیدی) ترشح شده توسط ریشه‌ی میزبان و جذب آن‌ها توسط رایزوبیا، منجر به تولید فاکتورهای Nod باکتریایی می‌شود (Gifford et al., 2018). این سیگنال‌های باکتریایی توسط گیرنده‌های شبیه کیناز LysM^۱ گیاه میزبان، درک می‌شوند و یک آبشار سیگنالینگ در ریشه گیاه به نام مسیر سیگنالینگ همزیستی^۲ (CSSP) و مسیرهای هورمون گیاهی از جمله سیتوکینین و اکسین را القا می‌کنند (Buhian & Bensmihen, 2018). وقفه در این مراحل سیگنالینگ می‌تواند کارایی گره‌زایی را کاهش دهد یا آن را به‌طور کلی متوقف نماید. حبوبات هم‌چنین دارای یک حلقه سیگنالی بازخوردی^۳ برای کنترل گره‌زایی هستند، چرا که افزایش تعداد گره‌ها ممکن است نیتروژن گیاه میزبان را بهبود بخشد، با این حال تعداد بیش از حد گره‌ها، به‌دلیل هزینه‌های انرژی گیاه برای تشکیل و نگهداری گره، بر سلامت گیاه تأثیر منفی می‌گذارد (Ferguson et al., 2019).

ایزوفلاوونوئیدها به‌عنوان ترکیبات فیتوکمیکال گیاهی شناخته می‌شوند. این ترکیبات، به‌ویژه ایزوفلاوونوئیدهای متیله شده، نقش مهمی در مقاومت گیاهان به استرس‌های محیطی، بیماری‌ها و آفات ایفا می‌کنند. در گیاهان لگوم مانند نخود (*Cicer arietinum*)، ایزوفلاوونوئیدها در دفاع گیاه در برابر عوامل بیماری‌زا و القای بیان ژن nod جهت جذب شیمیایی رایزوبیوم، نقش اساسی دارند. هم‌چنین ایزوفلاوونوئیدها به‌دلیل خواص آنتی‌اکسیدانی و ضدسرطانی، برای انسان‌ها نیز مفید می‌باشند (Wang et al., 2018).

ایزوفلاون ۴-O-متیل ترانسفراز^۴ (I4'OMT) یک آنزیم از خانواده O-methyltransferases (OMTs) می‌باشد که کاتالیز انتقال گروه متیل از S-آدنوزیل-آل-

^۱ Feedback signalling loop

^۲ Isoflavone 4'-O-Methyltransferase

^۳ LysM receptor-like kinases

^۴ Common Symbiosis Signalling Pathway (CSSP)

این تحقیق در آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشکده کشاورزی و گلخانه دانشگاه کردستان انجام گرفت. در این تحقیق باکتری *M. ciceri* از موسسه تحقیقات خاک و آب ایران تهیه گردید. به منظور تکثیر و نگهداری رازیوبیوم از محیط کشت Yeast Manitol Agar استفاده شد.

برای تهیه سوسپانسیون رازیوبیومی به عنوان مایه تلقیح، یک کلون رشد یافته روی محیط جامد به محیط YMA فاقد آگار منتقل گردید. بعد از گذشت ۴ تا ۵ روز، سلول‌های رازیوبیوم رشد یافته و به غلظت مورد نظر برای تلقیح (10^9 سلول در هر میلی لیتر) رسیدند. برای اطمینان از رشد باکتری و تعیین غلظت مناسب جهت تلقیح، جذب سوسپانسیون رازیوبیومی در طول موج ۶۰۰ نانومتر قرائت شد که حدود ۱ بود.

برای انتخاب ژنوتیپ‌ها، ده ژنوتیپ مختلف خود که تنوع ژنتیکی مناسبی داشتند (شامل ژنوتیپ‌های مورد استفاده در آزمایش گلخانه‌ای و دیگر واریته‌های مرجع) انتخاب شدند. رقم‌های مختلف خود شامل بیونج، Selq St، آرمان، گوکسو، ILC، منصور، سعید، پیروز، آنا و کاکا با باکتری *M. ciceri* تلقیح شدند و پایان دوره رشد، صفاتی مانند تعداد گره، وزن گره، وزن تر کل گیاه، وزن خشک کل گیاه، وزن خشک ساقه، وزن خشک ریشه، طول ساقه، طول ریشه، در هر گلدان اندازه‌گیری شد.

بدین منظور سطح خارجی رقم‌های مختلف بذر خود با اتانول ۷۵ درصد به مدت ۳۰ ثانیه و هیپوکلریت سدیم ۵ درصد به مدت ۲ دقیقه ضدعفونی شدند. پس از شست‌شو با آب مقطر، بذرهای استریل شده در سوسپانسیون باکتریایی *M. ciceri* غوطه‌ور شده و سپس در سه تکرار در گلدان‌هایی شامل خاک مزرعه، ماسه و پرلایت استریل و اتوکلا شده کشت شدند. گلدان‌ها، روزانه با محلول غذایی هوگلند فاقد نیتروژن آبیاری گردید. بعد از گذشت ۶ روز گیاهچه‌ها با سوسپانسیون رازیوبیوم تلقیح شدند. سوسپانسیون به پایه ساقه هر گیاهچه اضافه گردید. گیاهان در شرایط محیطی کنترل شده با سیکل نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی و رطوبت نسبی ۷۰٪ در طول دوره رشد در گلخانه دانشکده کشاورزی دانشگاه کردستان نگهداری شدند و در هفته ششم کشت، برداشت شده و وزن و تعداد گره‌ها در هر

از پایگاه داده (<http://pfam.xfam.org>) دامین‌های پروتئینی مربوط به توالی‌های ژن *I4'OMT* به دست آمد. از پایگاه داده (<http://ca.expasy.org/tools/protp>) (aram.html) ویژگی‌های شیمیایی پروتئین‌ها شامل نقطه ایزوالکتریک، وزن مولکولی تعیین شد.

موتیف‌های حفظ شده‌ی این توالی‌ها با استفاده از سایت موتیف (MEME, <http://meme-suite.org>) با پارامترهای حداکثر ۱۰ موتیف، طول موتیف بین ۶ تا ۵۰ نوکلئوتید، تعداد موتیف تکرار شونده در هر توالی zero یا one، شناسایی شد و مکان فیزیکی این ژن بر روی کروموزوم‌های نخود از سایت mg2c.iask.in مشخص گردید.

برای پیش‌بینی ساختارهای اگزون-اینترون از سایت Gene structure display server استفاده شد. همچنین با استفاده از سایت www.sbg.bio.ic.ac.uk ساختار و شکل سه بعدی ژن مدنظر تعیین گردید.

آنالیز بیان ژن *I4'OMT* دخیل در مسیر سنتز فلاوونوئیدها با استفاده از داده‌های RNA-seq

داده‌های RNA-seq مربوط به پروژه PRJNA214031 انجام گرفته در ریشه و گره گیاه نخود با استفاده از نرم‌افزار [sra toolkit](http://sratoolkit.ncbi.nlm.nih.gov/) از سایت NCBI دانلود شد. این مجموعه شامل ۵ نمونه از ریشه و گره نخود در شرایط مختلف (شاهد، تلقیح‌شده در مراحل مختلف رشد) است. ماتریس‌های شمارش بیان ژن برای بافت‌ها و مراحل رشدی و در پاسخ به گره‌زایی، با استفاده از ابزارهایی چون Hisat2 و Htseq در لینوکس به دست آمد که در آن تنظیمات به صورت: `stranded=no--mode= intersection--t exon nonempty` تعریف شد. نتایج حاصل با استفاده از بسته‌های DESeq2 نرمال شد و با استفاده از بسته‌های به صورت گرافیکی به نمایش درآمد. برای تجزیه و تحلیل بیان افتراقی ژن *I4'OMT* $\log_2$ fold change ریشه نخود تلقیح‌شده با *Mesorhizobium ciceri* و ریشه‌ی شاهد (تلقیح نشده) محاسبه شد. با استفاده از Benjamini-Hochberg FDR، p-values تصحیح گردید.

مواد گیاهی و شرایط رشد

در سطح (۵ در صد) صورت گرفت. برای رسم نمودارها از برنامه Excel استفاده شد.

تهیه اسلاید میکروسکوپی

گره‌ها با تیغ استریل در مقیاس میلی‌متری برش عرضی و طولی داده شد. قطعات برش داده شده در هیپوکلرید سدیم یک درصد به مدت ۳ دقیقه قرار داده شد. بعد از گذشت مدت زمان مد نظر، هیپوکلرید سدیم دور ریخته شده و قطعات برش خورده با آب مقطر استریل شستشو داده شدند. سپس چند قطره رنگ متیل گرین به نمونه‌ها اضافه گردید و نمونه‌ها به مدت ۳ دقیقه در رنگ، نگه داشته شدند. نمونه‌ها با آب شستشو داده شده و در زیر میکروسکوپ نوری مدل OLYMPUS (BX52) مشاهده و بررسی شدند.

بررسی بیان ژن *I4'OMT*

بذر رقم‌های کاندید (بیونج و پیروز)، بعد از ضدعفونی و تلقیح با *M. ciceri* به خاک منتقل شد. از ریشه‌های آلوده، در بازه‌های زمانی 6HPI، 10DPI و 28 DPI نمونه‌گیری انجام گرفت. از تیمار شاهد نیز نمونه‌گیری به عمل آمد. ریشه‌های آلوده نشده (بدون گره) به عنوان بافت کنترل استفاده شد (Jahan et al., 2020). RNA کل با استفاده از روش استخراج LiCl (Choudhary et al., 2009). آن‌جا که RNA استخراج شده ممکن است دارای آلودگی DNA باشد، قبل از انجام Quantitative real time PCR از آنزیم DNase استفاده گردید. کیفیت RNA استخراج شده با استفاده از دستگاه نانودراپ و الکتروفورز ژل آگارز مورد بررسی قرار گرفت و پس از استخراج RNA، cDNA سنتز شد. برای بررسی بیان *I4'OMT* دخیل در مسیر سنتز فلاوونوئیدها، از آغازگرهای اختصاصی طراحی شده براساس قسمت‌های کد کننده ژن (CDS) استفاده شد. طراحی آغازگرها به کمک نرم افزار تحت وب Primer3plus انجام گرفت. از ژن GAPDH به عنوان کنترل داخلی استفاده شد (جدول ۱). بیان کمی ژن‌ها به روش RT-PCR و با استفاده از مسترمیکس Fast SYBR Green بررسی شد (Kant et al., 2016). برنامه‌ی حرارتی طبق جدول (۲) به دستگاه داده شد. میزان تغییرات بیان ژن‌ها، با استفاده از فرمول ($2^{-\Delta\Delta CT}$) محاسبه گردید. کل آزمایش رشد گیاه و تیمار با باکتری *M. ciceri* سه بار

گیاه شمارش گردید. سپس بخش‌های ساقه، ریشه و جدا شدند و برای اندازه‌گیری وزن خشک، به مدت ۷۲ ساعت در آون ۷۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری و خشک شدند. وزن خشک نمونه‌ها اندازه‌گیری شد و بر مبنای صفات اندازه‌گیری شده (تعداد گره)، یک رقم نخود با بهترین همزیستی و یک رقم نخود با کم‌ترین میزان همزیستی با باکتری مزورایزوبیوم انتخاب و برای انجام مرحله دوم آزمایش استفاده گردید.

آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار اجرا شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم افزار SAS و تجزیه واریانس‌ها با استفاده از ANOVA در سطح یک درصد ($P \leq 0.01$) انجام گرفت.

در مرحله دوم آزمایش، دو رقم نخود انتخاب‌شده از مرحله اول آزمایش با مزورایزوبیوم تلقیح شد. به مدت ۶ هفته در شرایط کنترل شده که در بالا اشاره شد، کشت داده شدند. در زمان‌های ۳۶ ساعت، ۱۰ روز و ۲۸ روز پس از تلقیح، از ریشه و گره نخود نمونه‌برداری شد و در ازت مایع منجمد و برای مطالعات بیشتر به فریز -۸۰ منتقل گردیدند.

اندازه‌گیری میزان رنگدانه‌های فتوسنتزی

برای سنجش میزان کلروفیل و کارتنوئید از روش Lichtenthaler (۱۹۸۹) استفاده شد. میزان کلروفیل‌ها و کارتنوئید توسط طیف سنج نوری در طول موج‌های ۴۴۵، ۶۶۳، ۷۰۰ نانومتر قرائت شد. میزان کلروفیل کل، کلروفیل a، کلروفیل b، کارتنوئید بر حسب میلی‌گرم در گرم وزن تر برگ محاسبه گردید (Lichtenthaler, 1987). آنالیز داده‌ها و مقایسات آماری توسط نرم افزار SAS انجام شد و رسم نمودارها به وسیله Excel 2019 انجام شد.

اندازه‌گیری میزان پروتئین

برای اندازه‌گیری مقدار کل پروتئین ریشه‌ی دو رقم بیونج و پیروز (بافت گره به عنوان تیمار و ریشه آلوده نشده به عنوان کنترل)، از روش کج‌لدار استفاده شد (Ballard & Charman, 2000). جهت تجزیه و تحلیل داده‌ها از نرم افزار SAS استفاده شد و مقایسه میانگین‌ها توسط آزمون Lsd

برای تولید سه تکرار بیولوژیکی و سه تکرار تکنیکی انجام گرفت.

جدول ۱. پرایمرهای مورد استفاده

Table 1. Primers used in this study

نام آغازگر	توالی آغازگر	دمای اتصال (درجه سانتی گراد)	طول قطعه تکثیرشده (جفت باز)
IF4A-F	ATCTTTGAAACTCCACCTTCT	۶۱	۱۱۸
IF4A-R	TTCTCCTTCTCCACCTTCTTG		
GAPDH-F	TGTCTCAGTTGTTGACCTTACAG	۶۰.۱	۱۵۸
GAPDH-R	CGACTTCATTGGTGATACTAGGT		

جدول ۲. چرخه دمایی واکنش Real time PCR

Table 2. Reaction temperature cycle in Real time PCR

تعداد چرخه	مرحله	زمان	دما (°C)
۱	واسرشت اولیه	۳ دقیقه	۹۵
۴۰	واسرشت سازی	۲۰ ثانیه	۹۵
	اتصال	۳۰ ثانیه	۶۲-۵۹
	گسترش	۱۵ ثانیه	۷۲
۱	ذوب	۵ دقیقه	۹۵-۷۰

یافته‌های پژوهش

بیوانفورماتیک

در شکل (۱-A)، دمین‌های آنزیم نشان داده شده است. این آنزیم از دو دمین Dimerisation و Methyltransf_2 تشکیل شده است. دمین Dimerisation، در موقعیت ۳۱-۷۹ قرار گرفته است. این دمین در ناحیه N ترمینال تعدادی از آنزیم‌های O-methyltransferase گیاهی یافت می‌شود و موجب دایمر شدن این پروتئین‌ها می‌شود. دمین Methyltransf_2، در موقعیت ۱۲۴-۳۵۲ قرار داشته و در آنزیم‌های O-methyltransferase ها وجود دارد که برخی از آن‌ها از S-adenosyl methionine به‌عنوان سوپسترای خود استفاده می‌کنند. شکل (۱-B)، نشان‌دهنده موتیف‌های محافظت‌شده در توالی آنزیم I4'OMT است. موتیف‌های محافظت‌شده شناسایی شده بر اساس پایگاه‌های داده PROSITE و InterPro عبارتند از: otif 1: PS00079

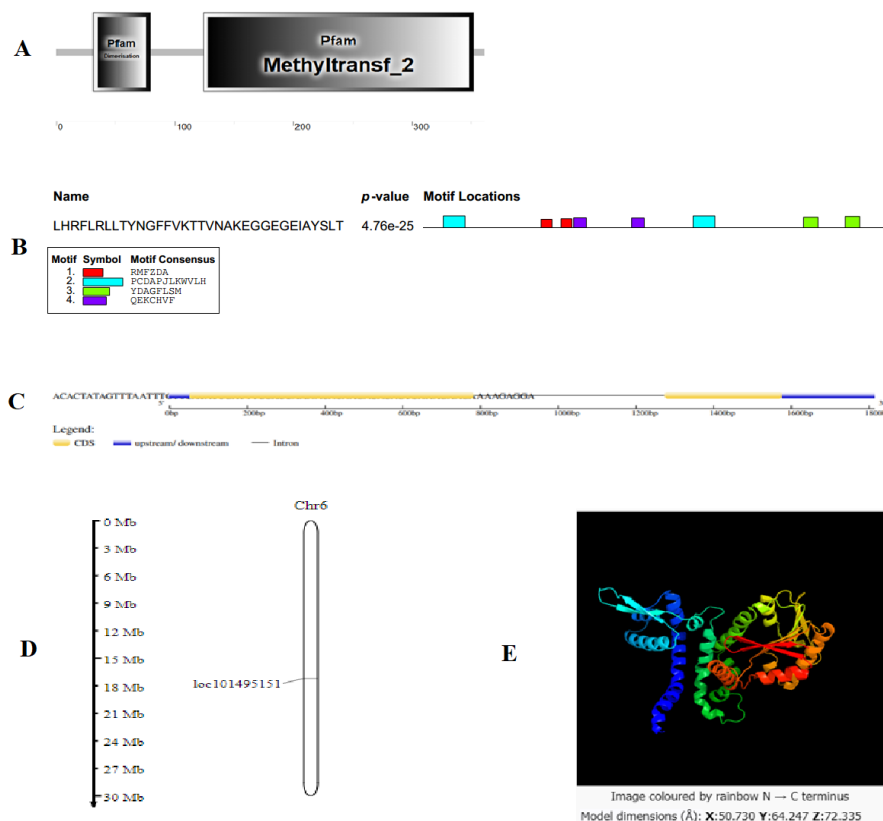
Motif 2: (Methyltransferase domain) و IPR000618 (S-adenosyl-L-(methionine-dependent methyltransferase). این موتیف‌ها در فرآیند اتصال به سوپستراها نقش دارند و ممکن است در عملکرد و پایداری ساختاری این ژن تاثیرگذار باشند. شکل (۱-C)، نواحی کد کننده و اینترون‌های ژن I4'OMT نشان می‌دهد. این ژن دارای دو اگزون و یک اینترون می‌باشد. قسمت‌های آبی رنگ بیانگر نواحی بالادست و پایین دست ژن مدنظر هستند.

شکل (۱-D)، بیانگر محل قرارگیری ژن I4'OMT در کروموزوم می‌باشد. نتایج نشان می‌دهد که ژن مذکور روی کروموزوم شماره شش گیاه نخود قرار گرفته است. با استفاده از سرور Phyre2.2 ساختار و شکل سه بعدی ژن مدنظر تعیین گردید. شکل (۱-E)، مدل سه بعدی پروتئین I4'OMT را نشان می‌دهد و ساختار فضایی آن را مشخص کرده است. در این مدل، ساختار پروتئین به‌طور واضح نمایان است و نواحی مختلف آن با رنگ‌های مختلف مشخص شده‌اند. این ساختار فضایی به درک بهتر

مقدار هیدروپاسیتی نشان داده شده است. نتایج نشان می‌دهد که این پروتئین تمایل بیشتری به هیدروفیلیک بودن دارد (یعنی بیشتر در محیط‌های آبی پایدار است).

نحوه‌ی عملکرد پروتئین در فرآیندهای بیولوژیکی کمک می‌کند.

در جدول (۳)، ویژگی‌های شیمیایی پروتئین شامل طول اسیدآمینه، وزن مولکولی، نقطه ایزوالکتریک و



شکل ۱. آنالیز بیوانفورماتیکی ژن و پروتئین *Isoflavone 4'-O-methyltransferase* در نخود.

(A) دمین‌های آنزیم *I4'OMT*؛ (B) موتیف‌های آنزیم *I4'OMT*؛ (C) ساختار ژن *I4'OMT*؛ (D) جایگاه ژن *I4'OMT* روی کروموزوم‌ها، (E) ساختار فضایی و سه بعدی پیش‌بینی‌شده پروتئین.

Figure 1. Bioinformatic analysis of the *Isoflavone 4'-O-methyltransferase (I4'OMT)* gene and protein in chickpea.

A) Enzyme domains of *I4'OMT*; B) Conserved motifs of *I4'OMT* enzyme; C) Gene structure of *I4'OMT*; D) Chromosomal location of the *I4'OMT* gene; E) Predicted three-dimensional structure of the *I4'OMT* protein.

جدول ۳. ویژگی شیمیایی پروتئین *Isoflavone 4'-O-methyltransferase* در نخود

Table 3. Physicochemical properties of the *Isoflavone 4'-O-methyltransferase (I4'OMT)* protein in chickpea.

Protein ID	GeneID:	Gene name	AA length	MW(kDa)	pI	Gravity c
XP_004505107	101495151	isoflavone 4'-O-methyltransferase	361	40353.07	5.38	-0.225

Heatmap بیان ژن‌های مختلف در گیاه نخود را نشان می‌دهد که در شرایط تیمار با باکتری ریزوبیوم و در مقایسه با گیاه شاهد ارزیابی شده است. نتایج نشان می‌دهد که بیان ژن *I4'OMT* در گیاه نخود تیمار شده با

تجزیه و تحلیل بیان ژن *I4'OMT* با استفاده از داده‌های RNA-seq

نتایج حاصل از آنالیز *insilico* بیان ژن *I4'OMT* در شکل (۲) نشان داده شده است. شکل ۲ نقشه‌ی

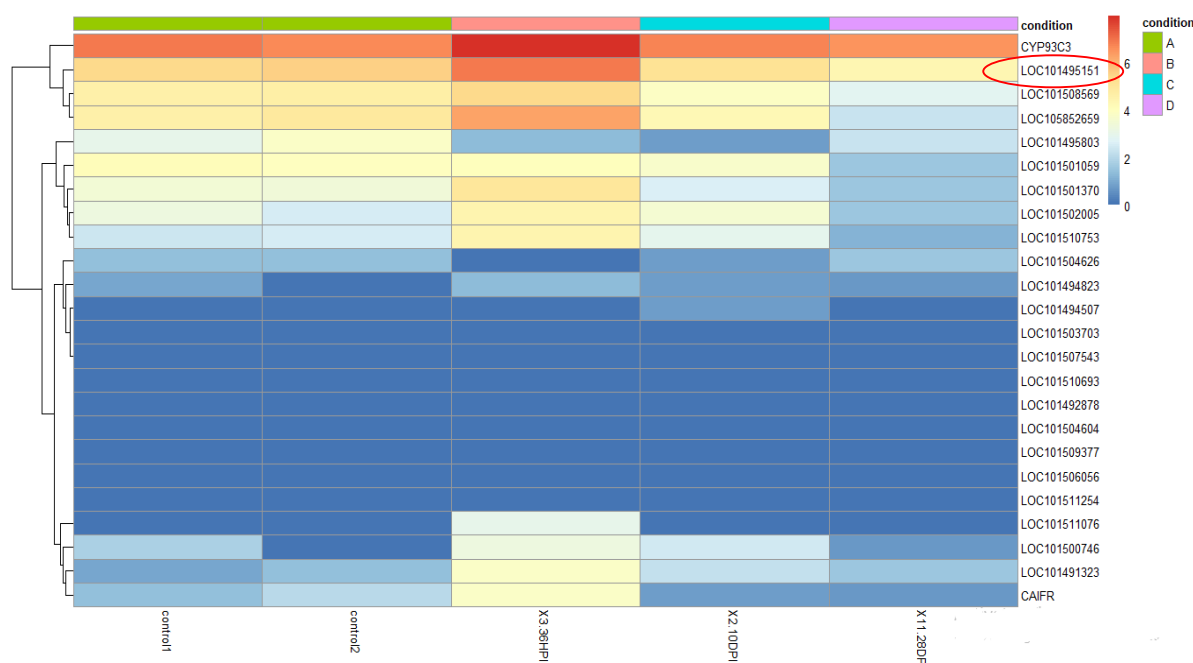
نشان می‌دهند (3C). هرچه سلول‌ها به سمت مرستم نزدیک‌تر شوند، کوچک‌تر خواهند شد تا زمانی که دیگر سلول‌های منفرد دیگر قابل تشخیص نباشند. سلول‌های ناحیه‌ی Infection zone به‌دلیل کوچک‌تر بودن اندازه‌هایشان، بیشتر رنگ آمیزی شده و در تصویر میکروسکوپ نوری، متراکم‌تر به نظر می‌رسند. وجود باکتری در فضاهای داخل سلولی ریشه، نشان می‌دهد که باکتری‌ها با موفقیت توانسته‌اند به سلول‌های گره وارد شوند.

صفات فیزیولوژیکی اندازه‌گیری شده

در این مطالعه، اختلافات میانگین‌های صفات مختلف در ارقام مختلف با استفاده از ANOVA در سطح یک درصد ($P \leq 0.01$) انجام گرفت و از حروف برای نشان دادن معنی‌داری اختلافات استفاده شده است. مقایسه‌ی مقادیر میانگین تعداد گره، وزن گره، وزن تر کل گیاه، وزن خشک کل گیاه، وزن خشک ساقه، وزن خشک ریشه، طول ساقه، طول ریشه در رقم‌های نخود تلقیح شده با *M. ciceri* نشان داد که این میانگین‌ها در تمام رقم‌های نخود مورد بررسی در سطح ۱٪ متفاوت است (جدول ۴).

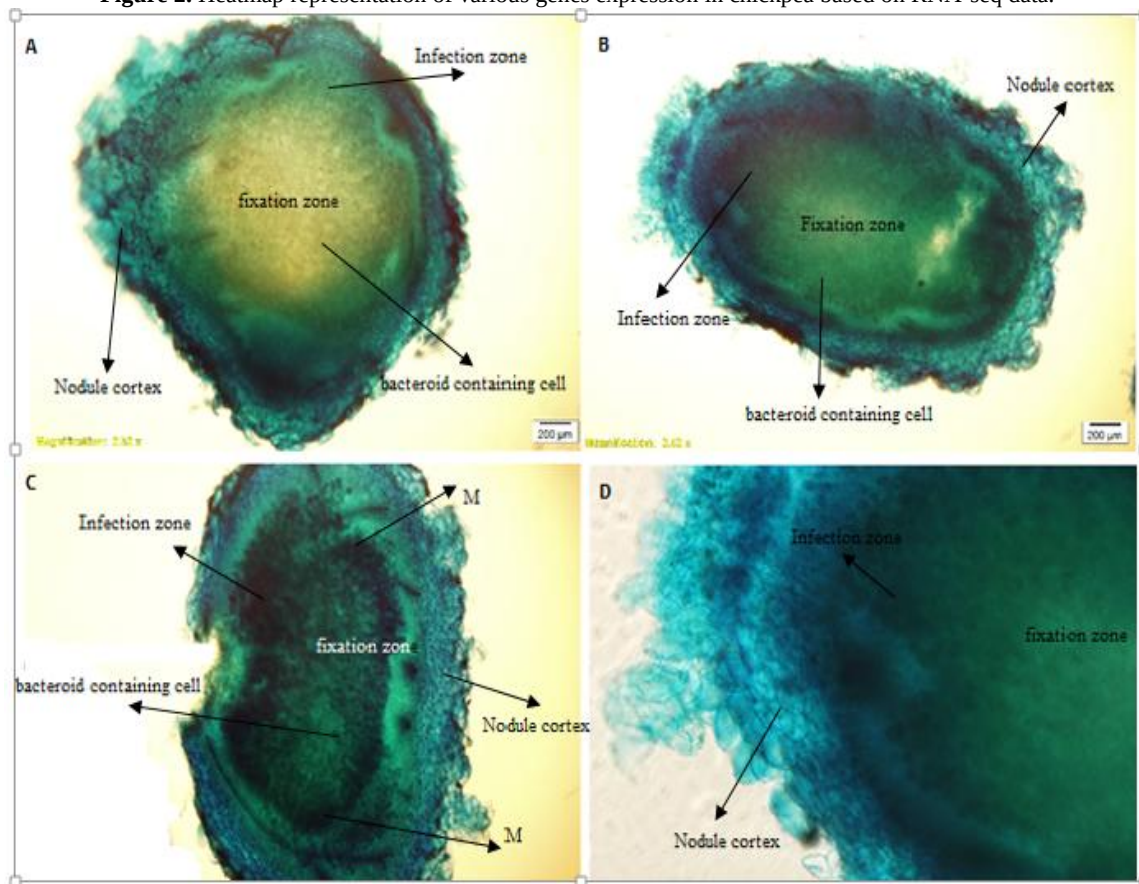
باکتری رایزوبیوم ۳۶ ساعت پس از تلقیح به‌طور قابل توجهی نسبت به گیاه شاهد افزایش یافته است. ولی در زمان‌های ۲۸ و ۱۰ روز پس از تلقیح، تغییر معناداری نسبت به گیاه شاهد (کنترل) نشان نداده است. این تغییرات در نقشه Heatmap با رنگ‌های تیره‌تر که نمایانگر افزایش بیان ژن‌ها هستند، قابل مشاهده است. غلظت کم نیتروژن خاک باعث افزایش بیان و تجمع تعدادی از ایزوفلاونوئیدها مانند daidzein و genistein در خاک می‌شود که به‌عنوان مولکول‌های سیگنالی و جاذب باکتری خاکزی رایزوبیوم عمل می‌کنند. این افزایش بیان ژن *I4'OMT* در ساعات اولیه تلقیح با باکتری رایزوبیوم می‌تواند نشان‌دهنده برهمکنش مثبت گیاه نخود با رایزوبیوم باشد و اطلاعات بیشتری را در مورد مکانیزم‌های همزیستی این دو فراهم می‌کند.

شکل (۳)، تصویر میکروسکوپی نوری از یک برش بافت گره رنگ آمیزی شده با متیل گرین، را نشان می‌دهد. متیل گرین هسته و لیگنین دیواره سلولی را رنگ آمیزی می‌نماید. در شکل 3A, 3B, 3C, 3D، حلقه‌ی باکتریوئیدی در سلول‌های رنگ آمیزی شده در ناحیه تثبیت نیتروژن (Fixation zone) مشاهده می‌شود. گره‌ها یک مرستم دوتایی (m) را در جهات مخالف



شکل ۲. نقشه Heatmap بیان ژن‌های مختلف در گیاه نخود رسم شده با استفاده از داده‌های RNA-seq

Figure 2. Heatmap representation of various genes expression in chickpea based on RNA-seq data.



شکل ۳. تصاویر گرفته شده با میکروسکوپ نوری از سلول‌های رنگ آمیزی شده با متیل گرین. سلول‌های منفرد حاوی باکتریوئید (ba) را می‌توان با حلقه‌های تیره داخل سلول‌ها، جایی که سلول‌های *M. ciceri* انباشته می‌شوند، تشخیص داد.

Figure 3. Light microscopy images of cells stained with methyl green. Individual cells containing bacteroids (ba) can be identified by dark rings within the cells, indicating the accumulation sites of *Mesorhizobium ciceri* cells.

آرمان با میانگین ۳۱۰۸,۶۹۷ کم‌ترین وزن را دارد. در صفت وزن خشک کل گیاه (میلی گرم)، رقم سعید با میانگین ۲۷۳۵,۷۵۹ بیش‌ترین وزن خشک کل را داشت و اختلاف معنی‌داری با ارقام دیگر نشان داد. در وزن خشک ساقه و برگ (میلی گرم)، رقم سعید با میانگین ۱۱۲۶,۹۳۱ بیش‌ترین وزن خشک و آرمان با میانگین ۲۵۸ کم‌ترین وزن خشک را نشان داد. در وزن خشک ریشه (میلی گرم)، رقم سعید و کاکا با میانگین‌های مشابه بیش‌ترین وزن خشک ریشه را داشتند. در صفت طول ساقه گیاه (سانتی‌متر)، رقم selq st با میانگین ۳۲ بیش‌ترین طول ساقه را داشت و رقم کاکا و پیروز کم‌ترین طول ساقه را نشان دادند و

در صفت تعداد گره‌ها در هر گیاه، رقم بیونج دارای بیش‌ترین تعداد گره‌ها با میانگین ۱۲۰ می‌باشد و اختلاف معنی‌داری با سایر ارقام دارد. ارقام پیروز و آرمان به ترتیب با میانگین‌های ۳۹ و ۴۲,۶۶۳، کم‌ترین تعداد گره‌ها را نشان دادند. در صفت وزن کل گره‌ها در هر بوته، رقم بیونج با میانگین ۱۸۰۷,۳۳۳ میلی گرم بیش‌ترین وزن را داشت که اختلاف معنی‌داری با ارقام دیگر داشت. در حالی که رقم پیروز با میانگین ۵۸۲,۳۹۳ کم‌ترین وزن گره‌ها را دارا می‌باشد. در صفت وزن کل تازه گیاه (میلی گرم)، رقم سعید با میانگین ۹۴۲۴,۵۵۴ دارای بیش‌ترین وزن کل تازه است و اختلاف معنی‌داری با ارقام دیگر دارد. در مقابل، رقم

از آن جایی که این دو رقم مذکور پایه کوتاه می‌باشند، (سانتی‌متر)، رقم بیونج و سعید با میانگین‌های مشابه این نتایج قابل توجه است. در طول ریشه گیاه ۳۶ بیش‌ترین طول ریشه را نشان دادند. جدول ۴. میانگین تعداد گره، وزن گره، وزن تر کل گیاه، وزن خشک کل گیاه، وزن خشک ساقه، وزن خشک ریشه، طول ساقه، طول ریشه در رقم‌های نخود تلقیح‌شده با *M. ciceri* در سطح یک درصد ($P \leq 0.01$).

Table 4. Mean values of nodule number, nodule weight, total fresh weight, total dry weight, shoot dry weight, root dry weight, shoot length, and root length in chickpea cultivars inoculated with *Mesorhizobium ciceri*, with significance at the 1% level ($P \leq 0.01$).

Cultivar	Nodule number/plant	Nodule weight (mg FW)	Total Fresh Weight (mg FW/plant)	Total Dry Weight (mg DM/plant)	Shoot weight (mg DM/plant)	Root weight (mg DM/plant)	Shoot Length/Plant (cm)	Root Length/Plant (cm)
Bionij	120 a	1807.333 a	6170 bc	1402.641 bc	391.333 b	937 abc	26 bc	29 bc
Selq St	105.67 b	1761.352 a	7729 ab	1917.367 ab	847.801 ab	969.617 abc	32 a	36 a
Mansoor	90 c	1354 b	7786.412 ab	2137 ab	823 ab	1241.745 ab	26.974 bc	34.208 a
Saeed	89.65 c	1361 b	9424.554 a	2735.759 a	1126.931 a	1539.625 a	23 cd	36.423 a
ILC	88 cd	1178.667 b	6628 b	1593 bc	598.302 ab	931.377 abc	20 de	32.333ab
Kaka	78 de	1238.325 b	8468.876 ab	2278 ab	792.32 ab	1422.441 a	16 f	32 ab
Ana	74.547 e	888 c	7021 abc	2580 abc	1075.635 a	1417.601 a	21 de	32.036 ab
Goksoo	61 f	767.487 d	5316 cd	1132.771 cd	373.666 b	707 abc	28.84 ab	34.119 a
Arman	42.663 g	639.128 d	3108.697 de	720.143 de	258 b	416 bc	17.568 ef	26.096 cd
Pirooz	39 g	582.393 d	2617.221 e	665.678 de	370.885 b	258.203 a	15 f	21.607 d

میانگین‌های مربوط به هر صفت در رقم‌های مختلف که دارای حروف مشترک می‌باشند، در سطح احتمال یک درصد، تفاوت معناداری ندارند.

Means sharing the same letter for each trait among different cultivars are not significantly different at the 1% probability level.

درصد نیتروژن گره و ریشه شاهد

بررسی به‌دست آمده از مقایسات میانگین درصد نیتروژن گره در دو رقم بیونج و پیروز تحت تأثیر تیمار با باکتری رایزوبیوم نشان داد که رقم بیونج به‌طور معناداری نیتروژن بیشتری را نسبت به رقم پیروز جذب و تثبیت کرده است. همان‌طور که در نمودار Boxplot مشخص است، میانگین و میانه درصد نیتروژن در رقم بیونج بیشتر از پیروز بوده و دامنه تغییرات نیز وسیع‌تر است (نمودار ۲). در نمودار تعاملی (نمودار ۲) نیز مشاهده می‌شود که تأثیر تیمار رایزوبیوم بر افزایش نیتروژن در هر دو رقم مثبت بوده، اما شدت پاسخ در رقم بیونج بسیار بالاتر بوده است. در مقابل، در شرایط شاهد (بدون تیمار)، هر دو رقم درصد نیتروژن پایینی داشتند که نشان‌دهنده تأثیر مستقیم تلقیح بر فرآیند تثبیت زیستی نیتروژن است.

نتایج تحلیل واریانس (ANOVA) نشان داد که هم نوع رقم (Cultivar) و هم تیمار با باکتری رایزوبیوم (Treatment) اثر معنی‌داری در سطح $P < 0.01$ بر درصد نیتروژن گره داشتند. همچنین، اثر متقابل رقم $\times$ تیمار (Cultivar $\times$ Treatment) نیز معنی‌دار بود، که نشان‌دهنده پاسخ متفاوت ارقام به تیمار است (جدول ۵).

نتایج حاصل از اندازه‌گیری میزان رنگدانه‌های فتوسنتزی

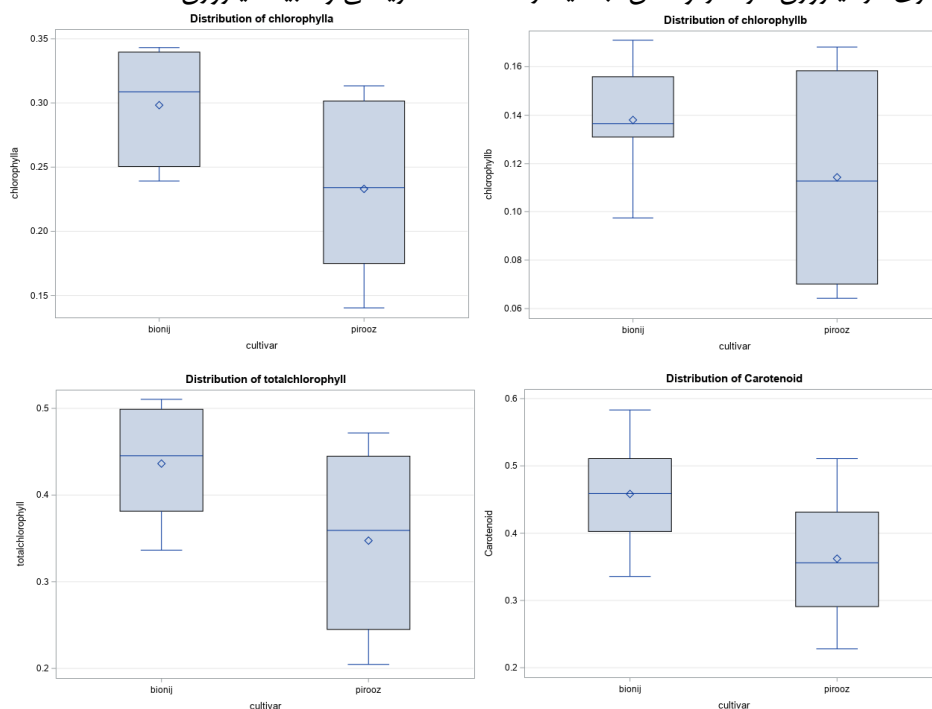
توزیع داده‌های مربوط به چهار شاخص فتوسنتزی کلروفیل a، کلروفیل b، کلروفیل کل و کارتنوئید برای دو رقم بیونج و پیروز، در قالب چهار نمودار boxplot بررسی شده است (نمودار ۱).

بررسی میانگین مقادیر شاخص‌های فتوسنتزی شامل کلروفیل a، کلروفیل b، کلروفیل کل و کارتنوئید در دو رقم مورد مطالعه بیونج پیروز نشان داد که تیمار با باکتری رایزوبیوم منجر به افزایش این پارامترها در هر دو رقم شده است. با این حال، میزان این افزایش در رقم بیونج نسبت به پیروز به‌طور معناداری بیشتر بود.

به‌طور کلی، مقدار کلروفیل a و کلروفیل کل در رقم بیونج به‌طور چشمگیری نسبت به رقم پیروز بیش‌تر می‌باشد، که بیانگر عملکرد بهتر این رقم در شرایط همزیستی با باکتری رایزوبیوم می‌باشد. همچنین مقدار کارتنوئید نیز در رقم بیونج بیشتر بوده که نشان‌دهنده افزایش توانایی آنتی‌اکسیدانی و سازگاری نوری آن است.

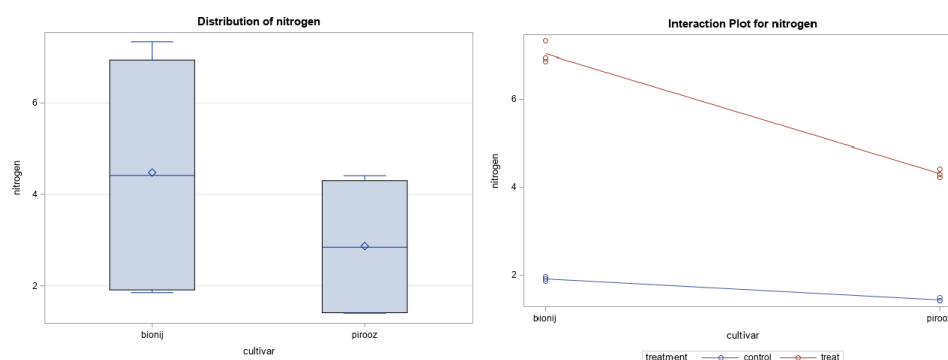
رایزوبیوم نشان داد، که حاکی از توان بالاتر این رقم در همزیستی و تثبیت نیتروژن است.

به‌طور مشخص، رقم بیونج در مقایسه با پیروز، افزایش بیشتری در نیتروژن گره در واکنش به تیمار



نمودار ۱. نمودار boxplot مربوط به مقایسه میانگین شاخص‌های کلروفیل a، کلروفیل b، کلروفیل کل و کاروتنوئید در دو رقم گیاهی بیونج و پیروز تحت تیمار با رایزوبیوم سطح احتمال ۵ درصد ($P \leq 0.05$).

Figure 1. Boxplot diagram comparing the mean values of chlorophyll a, chlorophyll b, total chlorophyll, and carotenoid indices in two chickpea cultivars, Bionij and Pirooz, under *Rhizobium* treatment, with significance at the 5% probability level ($P \leq 0.05$).



نمودار ۲. مقایسه میانگین درصد نیتروژن در گره ریشه دو رقم نخود (بیونج و پیروز) تحت تأثیر تیمار با باکتری رایزوبیوم و شاهد (بدون تیمار). اختلاف میانگین‌ها در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌دار بوده است.

Figure 2. Comparison of the mean percentage of nitrogen in root nodules of two chickpea cultivars (Bionij and Pirooz) under *Rhizobium* treatment and control (untreated). Differences between means are significant at the 5% probability level ($P \leq 0.05$).

جدول ۵. نتایج تجزیه واریانس (ANOVA) اثر رقم، تیمار رایزوبیوم و برهم‌کنش آن‌ها بر درصد نیتروژن گره‌های ریشه در دو رقم نخود.

Table 5. Analysis of variance (ANOVA) results for the effects of cultivar, *Rhizobium* treatment, and their interaction on the percentage of nitrogen in root nodules of two chickpea cultivars.

Source	df	Type I SS	Mean Square	F Value	P-Value	Significance
cultivar	1	7.77630000	7.77630000	399.47	<.0001	**

Treatment	1	48.32053333	48.32053333	2482.22	<.0001	* *
cultivar*treatment	1	3.83070000	3.83070000	196.78	<.0001	* *

***: indicates significance at the 1% probability level ($P \leq 0.01$).

** نشان دهنده معنی داری در سطح احتمال ۱ درصد است.

به شدت افزایش یافته است (بیش از ۸ برابر نسبت به شاهد). این افزایش زود هنگام، احتمالاً بیانگر پاسخ سریع و مؤثر ریشه به حضور باکتری است که می تواند باعث شروع موفقیت آمیز مسیر همزیستی شود. در زمان ۱۰ و ۲۸ روز پس از تلقیح، بیان ژن در بیونج کاهش یافته، که می تواند نشان دهنده پایان فاز اولیه سیگنالینگ و آغاز تثبیت رابطه همزیستی باشد.

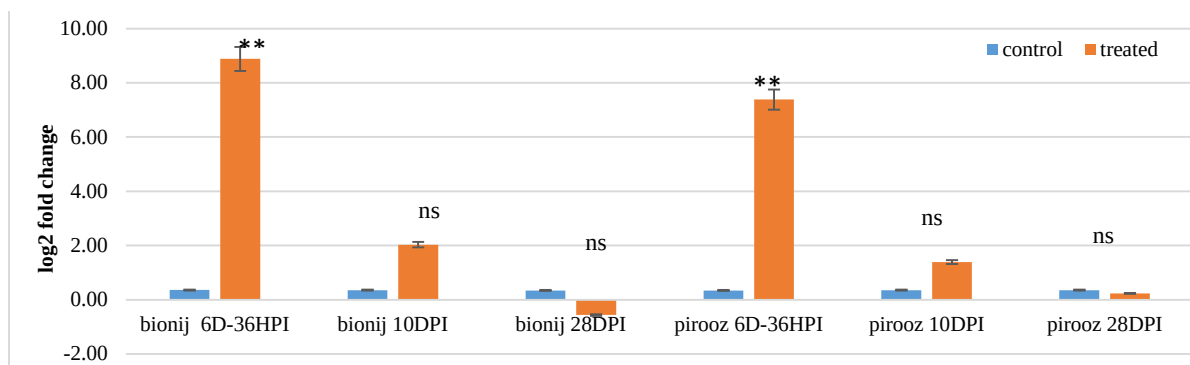
همچنین در رقم پیروز، که کمترین تعداد گره را داشت، افزایش بیان در ۳۶ ساعت پس از تلقیح مشاهده شد ولی این افزایش بیان نسبت به رقم بیونج کمتر بود (حدود ۵٫۳ برابر نسبت به شاهد). این تفاوت ممکن است بیانگر پاسخ سیگنالی ضعیف تر یا تأخیر در تعامل اولیه با رازوبیوم باشد. همچنین در زمان های ۱۴ و ۲۸ روز، بیان ژن در پیروز به مراتب پایین تر از بیونج باقی مانده است که ممکن است با کارایی کمتر در گره زایی در ارتباط باشد. به دلیل عدم تفاوت بیان ژن *I4'OMT* در بین گیاهان شاهد ارقام بیونج و پیروز، فولد چینج صفر به دست آمد و در نمودار صفر نشان داده شده است.

افزایش قابل توجه بیان ژن *I4'OMT* در مرحله اولیه (36HPI) در رقم بیونج با توان گره زایی بالاتر، به وضوح بیانگر نقش مهم این ژن در شروع تعامل همزیستی با رازوبیوم و در نتیجه افزایش نیتروژن تثبیت شده و رشد گیاه است. در مقابل، کاهش نسبی سطح بیان این ژن در رقم پیروز می تواند یکی از دلایل عملکرد ضعیف تر در گره زایی باشد.

نتایج بررسی بیان کمی ژن *I4'OMT* در گیاه نخود تحت تیمار *Mesorhizobium ciceri* با استفاده از ریل تایم

ژن *I4'OMT* در مسیر سنتز فلاوونوئیدها نقش دارد. این ترکیبات در جذب و شناسایی باکتری رازوبیوم و القای ژن های nod موثرند و همچنین به عنوان سیگنال های کلیدی در آغاز گره زایی عمل می کنند. به منظور بررسی بیان ژن *I4'OMT* در دو رقم بیونج و پیروز، در سه بازه زمانی پس از تلقیح با باکتری رازوبیوم، آزمایش Real-Time PCR انجام گرفت. زمان های مورد بررسی شامل ۳۶ ساعت پس از تلقیح (36HPI) در گیاهچه ی شش روزه، ۱۰ روز (14DPI) و ۲۸ روز (28DPI) پس از تلقیح بودند. به منظور نرمال سازی داده ها، از ژن مرجع GAPDH استفاده شد و محاسبه fold change بیان ژن به روش $2^{-\Delta\Delta Ct}$ صورت گرفت. در این مطالعه، بازه زمانی ۲۸ روز به دلیل استفاده از داده های بیوانفورماتیکی پروژه PRJNA214031 انتخاب شده است که شامل بازه های زمانی طولانی تر می باشد. این انتخاب به منظور همسویی و تأیید نتایج بیوانفورماتیکی با داده های آزمایشگاهی انجام شده است تا تغییرات بیان ژن در فازهای مختلف تعامل همزیستی به طور جامع تر بررسی شود. لذا، استفاده از بازه ۲۸ روز مکمل مطالعات قبلی با بازه های کوتاه تر است و به درک بهتر روندهای بیان ژن کمک می کند.

بر اساس نتایج به دست آمده (شکل ۴)، در رقم بیونج، که در نتایج قبلی بیشترین تعداد گره را در بین ده رقم مورد بررسی داشت، بیان ژن در زمان ۳۶ ساعت پس از تلقیح



شکل ۴. بیان نسبی ژن در بافت ریشه شاهد و ریشه تلقیح شده با باکتری رایزوبیوم در دو رقم بیونج و پیروز.
Figure 4. Relative gene expression in root tissues of control and *Rhizobium*-inoculated plants in two chickpea cultivars, Bionij and Pirooz.

خاک می‌تواند بیان پپتیدهای CLE را در ریشه حبوبات القا کند و مسیر AON را تحریک نماید و در نتیجه گره‌زایی سرکوب گردد (Murray et al., 2017). تفاوت در حساسیت ژنوتیپ‌های مختلف نخود نسبت به نیتروژن موجود در خاک، می‌تواند اختلاف در تعداد گره‌ها را توضیح دهد.

در تحقیق ما، نتایج مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که تیمار با باکتری رایزوبیوم موجب افزایش معنادار در میزان کلروفیل a، کلروفیل b، کلروفیل کل و کاروتنوئید در رقم بیونج نسبت به پیروز گردید. به‌طور کلی، رقم بیونج در تمامی پارامترهای فتوسنتزی مورد بررسی عملکرد بهتری از خود نشان داد و می‌تواند گزینه مناسبی در استفاده هم‌زیستی با باکتری رایزوبیوم باشد. دلیل علمی این تفاوت‌ها را می‌توان به افزایش ظرفیت تثبیت نیتروژن از طریق گره‌زایی بهتر در رقم بیونج نسبت داد. رایزوبیوم‌ها با تشکیل گره‌های ریشه‌ای در گیاهان لگوم نقش کلیدی در تأمین نیتروژن مورد نیاز دارند. نیتروژن یکی از عناصر ضروری برای سنتز کلروفیل است. بنابراین، افزایش تعداد و کارایی گره‌ها باعث دسترسی بیشتر گیاه به نیتروژن و در نتیجه سنتز بیشتر کلروفیل و رنگدانه‌های نوری می‌شود. نتایج به‌دست‌آمده با مطالعات پیشین نیز هم‌خوانی دارد که نشان داده‌اند هم‌زیستی مؤثر با رایزوبیوم موجب افزایش کلروفیل و بهبود فتوسنتز در گیاهان لگوم می‌شود (Mfilinge et al., 2014). به‌این ترتیب، رقم بیونج در شرایط هم‌زیستی با باکتری رایزوبیوم کارایی فتوسنتزی بالاتری از خود نشان داده و

بحث

تثبیت بیولوژیکی نیتروژن توسط رایزوبیا در محصولات لگوم نظیر نخود، برای تغذیه گیاه و کاهش مصرف کودهای نیتروژن دار، مهم می‌باشد. در مطالعه‌ی ما، مجدداً تأیید می‌شود که میزان تشکیل گره ریشه، هم به ژنوتیپ گیاه و هم به شرایط محیطی آن بستگی دارد. در این مطالعه نشان داده می‌شود که گره‌زایی وابسته به ژنوتیپ، در بین ۱۰ ژنوتیپ نخود با هم‌دیگرم تفاوت است و تعداد گره‌ها با صفات رشد گیاهی مانند وزن تر، وزن خشک، طول ساقه و ریشه مرتبط است.

تحقیقات به خوبی ثابت کرده است که محیط خاک بر جمعیت‌های رایزوبیوم تأثیر می‌گذارد (Greenlon et al., 2019). بنابراین، ما مطالعات مبتنی بر ژنوتیپ را در یک محیط خاک استریل انجام دادیم تا عوامل رقابتی بالقوه کنترل گردد. این آزمایش‌ها نشان داد که همه ژنوتیپ‌های گیاهی پاسخ یکسانی به باکترهای هم‌زیست در خاک ندارند. در میان ده ژنوتیپ آزمایش‌شده، تعداد گره‌ها به‌طور قابل‌توجهی با هم تفاوت داشتند. در مطالعات قبلی، تفاوت‌های خاص ژنوتیپ، در گره‌زایی و تثبیت نیتروژن، در تعداد محدودی از ژنوتیپ‌های نخود گزارش شده بود ($n < 7$) (Abi-Ghanem et al., 2012).

درک وضعیت نیتروژن توسط گیاه میزبان، به تعدادی از سیستم‌های سنسوری و مسیره‌های سیگنالینگ بستگی دارد که به‌نوبه خود بر مسیره‌های لازم برای گره‌زایی تأثیر می‌گذارد (Gent & Forde, 2017). به‌عنوان مثال، وجود سطوح بالای نیترات در

بنابراین، افزایش اولیه بیان *I4'OMT* ممکن است نشان‌دهنده‌ی پاسخ دفاعی اولیه گیاه باشد که پس از شناسایی ریزوبیوم به‌عنوان همزیست، کاهش می‌یابد و مسیرهای همزیستی فعال می‌شوند (Wu et al., 2024). به منظور تأیید نتایج حاصل از آنالیز بیان ژن *I4'OMT* با شناسه ژنی (LOC101495151)، الگوی بیان این ژن در داده‌های ترنسکریپتومی و به‌صورت نقشه حرارتی مورد بررسی قرار گرفت. بررسی heatmap نشان داد که این ژن در هر سه زمان پس از تلقیح با ریزوبیوم (۳۶ ساعت، ۱۰ روز، و ۲۸ روز) در مقایسه با نمونه‌های شاهد (control) دارای بیان بالاتری بود. بیشترین سطح بیان مربوط به زمان ۳۶ ساعت پس از تلقیح بود که به تدریج در زمان‌های ۱۰ و ۲۸ روز کاهش یافت.

نتایج حاصل از تحلیل real-time PCR بیان ژن، نشان داد که در پاسخ به تلقیح با باکتری *Rhizobium*، بیان ژن *I4'OMT* به طور معنی‌داری در هر دو رقم مورد مطالعه (بیونج و پیروز)، در زمان ۳۶ ساعت پس از تلقیح، افزایش یافت. و به تدریج در زمان‌های بعدی کاهش یافت (همخوانی بین داده‌های مولکولی و ترنسکریپتومی). این ژن که در مسیر بیوسنتز فلاونوئیدها نقش دارد، در شرایط شاهد (فاقد تلقیح) بیان ناچیزی داشت. این یافته‌ها با مطالعات پیشین هماهنگ است، چرا که در نبود باکتری همزیست، گیاه نیازی به تولید سیگنال‌های شیمیایی (نظیر فلاونوئیدها) برای آغاز تعامل همزیستی ندارد (Subramanian et al., 2006). افزایش بیان این ژن در زمان‌های ابتدایی پس از تلقیح، می‌تواند نشان‌دهنده‌ی فعال شدن مسیرهای سیگنالینگ برای جذب باکتری و القای ژن‌های nod باشد. از سوی دیگر، این بیان اولیه ممکن است بخشی از پاسخ دفاعی اولیه گیاه به حضور باکتری نیز تلقی شود، چرا که *Rhizobium* در ابتدا توسط سیستم ایمنی گیاه به عنوان یک موجود خارجی شناسایی می‌شود (Gao et al., 2022). اما با گذر زمان، این پاسخ تنظیم شده و تعامل همزیستی شکل می‌گیرد.

گزینه مناسبی برای استفاده در سیستم‌های زراعی زیست‌پایه خواهد بود.

مطالعات نشان داده است که تلقیح هم‌زمان گیاه *Vigna unguiculata* با ریزوبیوم و قارچ‌های میکوریزا باعث افزایش معناداری در محتوای کلروفیل a، b و کل کلروفیل می‌شود (Arumugam et al., 2010). در تحقیقی دیگر، تلقیح بذر *Phaseolus vulgaris* L. با سویه‌های مختلف ریزوبیوم باعث افزایش محتوای کلروفیل و درصد پروتئین در ارقام مختلف شد (Sara et al., 2013).

این مقالات و تحقیق حاضر نشان می‌دهند که تلقیح با ریزوبیوم می‌تواند به‌طور معناداری محتوای کلروفیل را در گیاهان لگوم افزایش دهد، که احتمالاً به دلیل بهبود تثبیت نیتروژن و افزایش دسترسی به این عنصر ضروری برای سنتز کلروفیل است.

نتایج حاصل از اندازه‌گیری پروتئین در گره گیاه تیمار شده با ریزوبیوم و ریشه‌های گیاه شاهد، حاکی از آن است که رقم بیونج دارای پاسخ‌پذیری بالاتری نسبت به همزیستی با ریزوبیوم بوده که می‌تواند ناشی از تفاوت‌های بیان ژن‌های دخیل در توانایی تشکیل گره یا انتقال نیتروژن از گره به اندام‌های هوایی باشد. رابطه مثبت بین میزان نیتروژن و میزان کلروفیل نیز در نتایج به‌دست آمده می‌تواند به دلیل وابستگی مستقیم سنتز کلروفیل به نیتروژن می‌باشد.

هنگامی که گیاه برای اولین بار با باکتری ریزوبیوم مواجه می‌شود، ممکن است یک پاسخ دفاعی اولیه غیرتخصصی به نام ایمنی القاشده توسط الگوهای مولکولی مرتبط با میکروب‌ها (PAMP-Triggered Immunity یا PTI) را فعال کند. در این مرحله، گیرنده‌های سطحی گیاه، الگوهای مولکولی عمومی باکتری مانند فلاژلین را شناسایی کرده و پاسخ‌های دفاعی را فعال می‌کنند (Liu et al., 2022).

افزایش اولیه بیان ژن *Isoflavone 4'-O-methyltransferase* پس از مواجهه با ریزوبیوم می‌تواند بخشی از این پاسخ دفاعی اولیه باشد. با این حال، در تعاملات همزیستی، گیاه به‌سرعت این پاسخ دفاعی را تعدیل می‌کند تا همزیستی مؤثر با باکتری برقرار شود.

فلانوییدی پس از برقراری همزیستی اولیه باشد. همچنین، ارتباط مثبت بین افزایش بیان این ژن و بهبود وضعیت نیتروژنی و فتوسنتزی گیاه بر اهمیت آن در فرایند همزیستی و انتخاب ارقام با کارایی بالاتر تأکید دارد. بر این اساس، ژن مذکور می‌تواند به عنوان شاخصی مؤثر در اصلاح و به‌نژادی ارقام نخود مورد استفاده قرار گیرد.

تعارض منافع

هیچ‌گونه تعارض منافع توسط نویسندگان وجود ندارد.

نتیجه‌گیری و پیشنهادات

نتایج این پژوهش نشان داد که بیان ژن *Isoflavone 4'-O-methyltransferase* به‌ویژه در مرحله اولیه پس از تلقیح (۳۶ ساعت) به طور معنی‌داری افزایش می‌یابد و این افزایش در رقم بیونج نسبت به رقم پیروز چشمگیرتر بود. این بیان بالا با عملکرد بهتر بیونج در گره‌زایی و میزان بالاتر کلروفیل و نیتروژن برگ همبستگی داشت که نشان‌دهنده توان همزیستی مؤثرتر این رقم با ریزوبیوم است. از سوی دیگر، کاهش تدریجی بیان ژن در زمان‌های بعدی می‌تواند نشان‌دهنده کاهش نیاز به سیگنال‌دهی

منابع

- Abi-Ghanem, R., Carpenter-Boggs, L., Smith, J.L., & Vandemark, G.J. (2012). Nitrogen fixation by US and middle eastern chickpeas with commercial and wild middle eastern inocula. *International Scholarly Research Notices*, 981842.
- Arumugam, R., Rajasekaran, S., & Nagarajan, S. (2010). Response of Arbuscular mycorrhizal fungi and Rhizobium inoculation on growth and chlorophyll content of *Vigna unguiculata* (L) Walp Var. Pusa 151. *Journal of Applied Sciences and Environmental Management*, 14.
- Ballard, R., & Charman, N. (2000). Nodulation and growth of pasture legumes with naturalised soil rhizobia. 1. Annual Medicago spp. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 40, 939-948.
- Buhian, W.P., & Bensmihen, S. (2018). Mini-review, nod factor regulation of phytohormone signaling and homeostasis during rhizobia-legume symbiosis. *Frontiers in plant science*, 9, 1247.
- Choudhary, S., Sethy, N.K., Shokeen, B., & Bhatia, S. (2009). Development of chickpea EST-SSR markers and analysis of allelic variation across related species. *Theoretical and Applied Genetics*, 118, 591-608.
- Deavours, B.E., Liu, C.-J., Naoumkina, M.A., Tang, Y., Farag, M.A., Sumner, L.W., Noel, J.P., & Dixon, R.A. (2006). Functional analysis of members of the isoflavone and isoflavanone O-methyltransferase enzyme families from the model legume *Medicago truncatula*. *Plant Molecular Biology*, 62, 715-733.
- Dwivedi, S.L., Sahrawat, K.L., Upadhyaya, H.D., Mengoni, A., Galardini, M., Bazzicalupo, M., Biondi, E.G., Hungria, M., Kaschuk, G., & Blair, M.W. (2015). Advances in host plant and rhizobium genomics to enhance symbiotic nitrogen fixation in grain legumes. *Advances in agronomy*, 129, 1-116.
- Ferguson, B.J., Mens, C., Hastwell, A.H., Zhang, M., Su, H., Jones, C.H., Chu, X., & Gresshoff, P.M. (2019). Legume nodulation, the host controls the party. *Plant, cell & environment*, 42, 41-51.
- Gan, Y., Johnston, A.M., Knight, J.D., McDonald, C., & Stevenson, C. (2010). Nitrogen dynamics of chickpea, Effects of cultivar choice, N fertilization, Rhizobium inoculation, and cropping systems. *Canadian Journal of Plant Science*, 90, 655-666.
- Gao, Y., Selee, B., Schnabel, E.L., Poehlman, W.L., Chavan, S.A., Frugoli, J.A., & Feltus, F.A. (2022). time series transcriptome analysis in *Medicago truncatula* shoot and root tissue during early nodulation. *Frontiers in plant science*, 13, 861639.
- Gent, L., & Forde, B.G. 2017. How do plants sense their nitrogen status? *Journal of Experimental Botany*, 68, 2531-2539.
- Gifford, I., Battenberg, K., Vaniya, A., Wilson, A., Tian, L., Fiehn, O., & Berry, A.M. (2018). Distinctive patterns of flavonoid biosynthesis in roots and nodules of *Datisca glomerata* and *Medicago* spp. revealed by metabolomic and gene expression profiles. *Frontiers in plant science*, 9, 1463.
- Greenlon, A., Chang, P.L., Damtew, Z.M., Muleta, A., Carrasquilla-Garcia, N., Kim, D., Nguyen, H.P., Suryawanshi, V., Krieg, C.P., & Yadav, S.K. (2019). Global-level population genomics reveals differential effects of geography and phylogeny on horizontal gene transfer in soil bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 116, 15200-15209.
- Jahan, M.S., Tahir, M.I., Inam-Ul-Haq, M., Shahzad, U., & Calica, P. (2020). Characterization of

- Genes Involved in the Autoregulation of Nodulation in Chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Journal of Engineering, Environment and Agriculture Research*, 2, 48-62.
- Kant, C., Pradhan, S., & Bhatia, S. (2016). Dissecting the root nodule transcriptome of chickpea (*Cicer arietinum* L.). *PLoS One*, 11, e0157908.
- Lichtenthaler, H.K. (1987). [34] Chlorophylls and carotenoids, pigments of photosynthetic biomembranes, *Methods in enzymology*. Elsevier, pp. 350-382.
- Liu, Y., Fernie, A.R., & Tohge, T. (2022). Diversification of chemical structures of methoxylated flavonoids and genes encoding flavonoid-O-methyltransferases. *Plants*, 11, 564.
- Merga, B., & Haji, J. (2019). Economic importance of chickpea, Production, value, and world trade. *Cogent Food & Agriculture*, 5, 1615718.
- Mfilinge, A., Mtei, K., & Ndakidemi, P. (2014). Effect of Rhizobium inoculation and supplementation with phosphorus and potassium on growth and total leaf chlorophyll (Chl) content of bush bean *Phaseolus vulgaris* L. *Agricultural Sciences*, 5, 1413-1426.
- Murray, J.D., Liu, C.-W., Chen, Y., & Miller, A.J. 2017. Nitrogen sensing in legumes. *Journal of Experimental Botany*, 68, 1919-1926.
- Nandety, R.S., Wen, J., & Mysore, K.S. (2023). *Medicago truncatula* resources to study legume biology and symbiotic nitrogen fixation. *Fundamental Research*, 3, 219-224.
- Plett, J.M., Plett, K.L., Bithell, S.L., Mitchell, C., Moore, K., Powell, J.R., & Anderson, I.C. (2016). Improved Phytophthora resistance in commercial chickpea (*Cicer arietinum*) varieties negatively impacts symbiotic gene signalling and symbiotic potential in some varieties. *Plant, cell & environment*, 39, 1858.
- Plett, K.L., Bithell, S.L., Dando, A., & Plett, J.M. (2021). Chickpea shows genotype-specific nodulation responses across soil nitrogen environment and root disease resistance categories. *BMC Plant Biology*, 21, 310.
- Roorkiwal, M., Bharadwaj, C., Barmukh, R., Dixit, G.P., Thudi, M., Gaur, P.M., Chaturvedi, S.K., Fikre, A., Hamwieh, A., & Kumar, S. (2020). Integrating genomics for chickpea improvement, achievements and opportunities. *Theoretical and Applied Genetics*, 133, 1703-1720.
- Sara, S., Morad, M., & Reza, C.M. (2013). Effects of seed inoculation by Rhizobium strains on chlorophyll content and protein percentage in common bean cultivars (*Phaseolus vulgaris* L.).
- Silva, V.M., Lui, A.C.W., de Carvalho, M.R., Namorato, F.A., Fei, Z., dos Reis, A.R., Liu, J., Vatamaniuk, O.K., & Li, L. (2024). The selenium-promoted daidzein production contributes to its induced nodulation in soybean plants. *Environmental and Experimental Botany*, 218, 105591.
- Subramanian, S., Stacey, G., & Yu, O. (2006). Endogenous isoflavones are essential for the establishment of symbiosis between soybean and Bradyrhizobium japonicum. *The Plant Journal*, 48, 261-273.
- Wang, Q., Liu, J., & Zhu, H. (2018). Genetic and molecular mechanisms underlying symbiotic specificity in legume-rhizobium interactions. *Frontiers in plant science*, 9, 313.
- Wu, W., Zhuang, Y., Chen, D., Ruan, Y., Li, F., Jackson, K., Liu, C.W., East, A., Wen, J., & Tatsis, E. (2024). Methylated chalcones are required for rhizobial nod gene induction in the *Medicago truncatula* rhizosphere. *New Phytologist*, 242, 2195-2206.
- Yadav, S.S., Redden, R., Chen, W., & Sharma, B. 2007. *Chickpea Breeding and Management*. CABI

Identification of ISSR Molecular Markers Associated with Morphological and Qualitative Forage Traits in *Elymus hispidus* (Opiz) Melderis var. villosus (Hackel) Assadi

Hooman Shirvani^{1*}, Alireza Etminan², Hooshmand Safari³

1. Ph.D. in Plant Breeding, Young Researchers and Elites Club, Islamic Azad University, Kermanshah Branch, Iran

2. Department of Genetics and Plant Breeding, Kermanshah Branch, Islamic Azad University, Kermanshah, Iran.

3. Forests and Rangelands Research Department, Kermanshah Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Kermanshah, Iran.

Correspondence:

Hooman Shirvani

Email: hooman.sh1366@yahoo.com

Received: 2, Jul. 2025

Accepted: 19, Nov. 2025

How to cite:

Shirvani, H., Etminan, A., & Safari, H. (2025). Identification of ISSR Molecular Markers Associated with Morphological and Qualitative Forage Traits in *Elymus hispidus* (Opiz) Melderis var. villosus (Hackel) Assadi. *Crop Biotechnology*, 15 (1), 29-46.
(DOI: [10.30473/cb.2025.75043.2012](https://doi.org/10.30473/cb.2025.75043.2012))

ABSTRACT

Due to its adaptability to environmental stresses such as drought and salinity, as well as its favorable forage quality, *Elymus hispidus* var. *villosus* plays a key role in sustainable rangeland management and forage production in arid and semi-arid ecosystems. This study was conducted to identify ISSR molecular markers associated with morphological traits and forage quality in 24 genotypes of this species. Morphological traits including plant height, number of stems per plant, flag leaf length, and dry forage yield, along with quality traits such as crude protein percentage, dry matter digestibility, and acid detergent fiber, were evaluated using near-infrared reflectance spectroscopy (NIR). Molecular analysis using 13 ISSR primers revealed a polymorphism rate of 97.94% and high genetic diversity among the genotypes, confirmed by PIC, EMR, MI, and RP indices. Analysis of variance showed significant differences in morphological traits (at 1% and 5% levels), while forage quality traits exhibited more limited variation. Mean comparison identified genotypes 23 and 10 as promising candidates for breeding programs due to their superior performance and morphological traits. Phenotypic correlations revealed a significant positive association (at the 5% level) between dry forage yield and plant height, internode length, and flag leaf length, with a stronger correlation (at the 1% level) with the number of stems per plant. Stepwise regression analysis demonstrated a significant association of marker IS11 with seven traits, and markers UBC880, UBC825, and UBC808 with several traits. These findings highlight the efficiency of ISSR markers in enhancing genetic improvement strategies for sustainable forage production.

KEYWORDS

Genetic diversity, forage, molecular marker, association mapping.



«مقاله پژوهشی»

شناسایی نشانگرهای مولکولی ISSR مرتبط با صفات مورفولوژیکی و کیفیت علوفه *Elymus hispidus* (Opiz) Melderis var. *villosus* (Hackel) Assadi

هومن شیروانی^{۱*}، علیرضا اطمینان^۲، هوشمند صفری^۳

چکیده

گونه *Elymus hispidus* var. *villosus* به دلیل سازگاری با تنش‌های محیطی نظیر خشکی و شوری و کیفیت علوفه‌ای مطلوب، نقش کلیدی در مدیریت پایدار مراتع و تولید علوفه در اکوسیستم‌های خشک و نیمه‌خشک ایفا می‌کند. این پژوهش با هدف شناسایی نشانگرهای مولکولی ISSR مرتبط با صفات مورفولوژیک و کیفیت علوفه در ۲۴ ژنوتیپ این گونه انجام شد. صفات مورفولوژیک شامل ارتفاع بوته، تعداد ساقه در بوته، طول برگ پرچم، و عملکرد وزن خشک علوفه، و صفات کیفی نظیر درصد پروتئین خام، قابلیت هضم ماده خشک، و فیبر محلول در شوینده اسیدی با استفاده از طیف‌سنجی مادون قرمز نزدیک (NIR) ارزیابی شدند. تحلیل مولکولی با ۱۳ آغازگر ISSR، چندشکلی ۹۷/۹۴٪ و تنوع ژنتیکی بالای ژنوتیپ‌ها را با شاخص‌های PIC، EMR، MI و RP تأیید کرد. تجزیه واریانس، تفاوت‌های معنی‌دار در صفات مورفولوژیک (سطوح ۱٪ و ۵٪) و تنوع محدودتر در صفات کیفیت علوفه را نشان داد. نتایج مقایسه میانگین ژنوتیپ‌های ۲۳ و ۱۰ را به دلیل برتری در عملکرد و صفات مورفولوژیک به‌عنوان کاندیداهای مطلوب برای برنامه‌های اصلاحی معرفی کرد. همبستگی فنوتیپی، ارتباط مثبت و معنی‌دار (سطح ۵٪) بین عملکرد وزن خشک علوفه با ارتفاع بوته، طول میانگره، و طول برگ پرچم، و ارتباط قوی‌تر (سطح ۱٪) با تعداد ساقه در بوته را نشان داد. تجزیه رگرسیون گام‌به‌گام، ارتباط معنی‌دار نشانگر IS11 با هفت صفت و نشانگرهای UBC808، UBC825، UBC880 با چندین صفت را آشکار ساخت. این یافته‌ها بر کارایی نشانگرهای ISSR در تقویت راهبردهای اصلاح ژنتیکی برای تولید علوفه پایدار تأکید دارد.

واژه‌های کلیدی

تنوع ژنتیکی، علوفه، نشانگر مولکولی، مکان‌یابی ارتباطی.

۱. دکتری اصلاح نباتات، باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کرمانشاه، ایران.
۲. گروه ژنتیک و بهنجاری گیاهی، واحد کرمانشاه، دانشگاه آزاد اسلامی، کرمانشاه، ایران.
۳. استادیار بخش تحقیقات جنگلها و مراتع، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان کرمانشاه، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی (AREEO)، کرمانشاه، ایران.

نویسنده مسئول:

هومن شیروانی

رایانامه: hooman.sh1366@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۰۴/۱۱

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۸/۲۸

استناد به این مقاله:

شیروانی، هومن؛ اطمینان، علیرضا و صفری، هوشمند (۱۴۰۴). شناسایی نشانگرهای مولکولی ISSR مرتبط با صفات مورفولوژیکی و کیفیت علوفه *Elymus hispidus* (Opiz) Melderis var. *villosus* (Hackel) Assadi، فصلنامه علمی زیست‌فناوری گیاهان زراعی، ۱۵ (۱)، ۲۹-۴۶.

(DOI: [10.30473/cb.2025.75043.2012](https://doi.org/10.30473/cb.2025.75043.2012))

مقدمه

گیاهان مرتعی و علوفه‌ای به‌عنوان منبعی حیاتی برای تغذیه دام و حفظ پایداری اکوسیستم‌های مرتعی، نقش کلیدی در کشاورزی و مدیریت منابع طبیعی ایفا می‌کنند. این گیاهان با توانایی رشد در شرایط محیطی سخت، مانند خاک‌های فقیر و مناطق کم‌آب، به کاهش فرسایش خاک و افزایش بهره‌وری مراتع کمک می‌کنند (کارلیر و همکاران، ۲۰۰۹). در شرایط تغییرات اقلیمی و افزایش تقاضا برای محصولات دامی، شناسایی گونه‌های علوفه‌ای با عملکرد و کیفیت بالا برای تضمین تولید پایدار علوفه ضروری است. مراتع، به‌ویژه در مناطق خشک و نیمه‌خشک، به‌عنوان یکی از مهم‌ترین منابع تأمین علوفه، نیازمند مدیریت و بهبود ژنتیکی هستند تا پاسخگوی نیازهای فزاینده باشند (وو و همکاران، ۲۰۲۵).

گونه *Elymus hispidus* (Opiz) Melderis var. *villosus* (Hackel) Assadi که در منابع گذشته *Agropyron trichophorum* شناخته می‌شد (اسدی، ۱۹۹۵)، به دلیل تحمل به تنش‌های محیطی مانند خشکی و شوری، و همچنین کیفیت علوفه‌ای مطلوب، از اهمیت ویژه‌ای در مراتع برخوردار است (ملکی و همکاران، ۲۰۲۳).

این گیاه به دلیل رشد سریع و توانایی تولید علوفه با ارزش تغذیه‌ای بالا، گزینه‌ای مناسب برای احیای مراتع و تولید علوفه در مناطق معتدل و نیمه‌خشک محسوب می‌شود. مطالعات نشان داده‌اند که این گونه می‌تواند در بهبود نظام‌های چرا و افزایش پایداری تولید علوفه نقش مؤثری داشته باشد (جونز و براون، ۲۰۲۰). تنوع ژنتیکی در *E. hispidus* var. *villosus* یکی از عوامل کلیدی برای موفقیت برنامه‌های اصلاحی است. این تنوع امکان شناسایی ژنوتیپ‌هایی با صفات برتر، مانند عملکرد بالا و مقاومت به شرایط نامساعد، را فراهم می‌کند (ملکی و همکاران، ۲۰۲۳).

بررسی‌های اخیر نشان داده‌اند که جمعیت‌های طبیعی این گونه دارای سطح بالایی از پلی‌مورفیسم ژنتیکی هستند که می‌تواند برای انتخاب ژنوتیپ‌های مناسب بهره‌برداری شود (کارادوس و چپمن، ۲۰۲۴).

صفات مورفولوژیک، مانند ارتفاع گیاه، تعداد پنجه، و سطح برگ، و صفات کیفی، مانند محتوای پروتئین خام و قابلیت هضم، از مهم‌ترین عوامل تعیین‌کننده ارزش

علوفه‌ای گیاهان مرتعی هستند (وو و همکاران، ۲۰۲۵). در *E. hispidus* var. *villosus*، این صفات می‌توانند به‌طور مستقیم بر عملکرد علوفه و کیفیت تغذیه‌ای آن برای دام تأثیر بگذارند. شناسایی ژنوتیپ‌هایی با ترکیب بهینه این صفات، به‌ویژه در شرایط محیطی چالش‌برانگیز، می‌تواند به بهبود بهره‌وری مراتع منجر شود (کارلیر و همکاران، ۲۰۰۹). با این حال، شناسایی دقیق این صفات و ارتباط آن‌ها با پایه ژنتیکی نیازمند ابزارهای مولکولی است.

مارکرهای ISSR (Inter Simple Sequence Repeat) به‌عنوان یکی از روش‌های مولکولی نسبتاً ارزان و فنی ساده، ابزار مناسبی برای مطالعات ژنتیکی در پروژه‌هایی با محدودیت منابع مالی محسوب می‌شوند. این روش هم به‌صورت دستی با استفاده از ژل‌های آگارز یا پلی‌آکریل‌آمید و هم به‌صورت خودکار با بهره‌گیری از پرایمرهای فلورسانس‌دار قابل اجرا است (گمیل و گریسون، ۲۰۲۱). نشانگرهای ISSR به‌دلیل پلی‌مورفیسم بالا، کاربرد گسترده‌ای در ارزیابی تنوع ژنتیکی، نقشه‌برداری ژنتیکی و برنامه‌های اصلاح نباتات مبتنی بر نشانگر (MAS)، به‌ویژه در محصولات باغی و زراعی دارند (وانگ و همکاران، ۲۰۰۲). از جمله مزایای مهم این تکنیک، نیاز به مقدار اندک DNA ژنومی است که آن را به گزینه‌ای مناسب برای گونه‌هایی با منابع محدود DNA، نظیر گونه‌های نادر، در معرض خطر یا مورد حفاظت تبدیل می‌کند (پرینس، ۲۰۱۵).

عملکرد این نشانگرها مبتنی بر تقویت نواحی بین توالی‌های تکراری ساده (microsatellites) است که الگوهای قابل تفسیری از پلی‌مورفیسم ژنتیکی را آشکار می‌سازند و برای شناسایی ژنوتیپ‌های مرتبط با صفات هدف، بسیار مؤثرند.

تجزیه ارتباط (Association Mapping) یک ابزار قدرتمند در ژنتیک گیاهی محسوب می‌شود که امکان نقشه‌برداری دقیق صفات را تا سطح ژن فراهم می‌سازد (ساهو و همکاران، ۲۰۱۵). برخلاف روش‌های سنتی نقشه‌یابی پیوستگی، تجزیه ارتباط می‌تواند بر پایه‌ی افراد غیرخویشاوند انجام شود، که این امر موجب می‌شود بتوان از آن در جمعیت‌هایی با زمینه‌های ژنتیکی متنوع بهره گرفت (خان و کوربان، ۲۰۱۲). از مهم‌ترین مزایای این روش، توانایی آن در شناسایی آلل‌های نادر است؛ این آلل‌ها ممکن است تأثیر مهمی در تنوع صفات داشته باشند و از این‌رو،

(جدول ۱). این ژنوتیپ‌ها برای ارزیابی صفات مورفولوژیک و کیفیت علوفه و همچنین بررسی مولکولی با استفاده از نشانگرهای ISSR مورد استفاده قرار گرفتند.

طرح آزمایشی

آزمایش در مزرعه تحقیقاتی مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان کرمانشاه، واقع در شهرستان اسلام‌آباد غرب، با مختصات جغرافیایی ۴۶ درجه و ۵۹ دقیقه طول شرقی، ۳۴ درجه و ۰۸ دقیقه عرض شمالی، ارتفاع ۱۲۶۰ متر از سطح دریا، میانگین بارندگی سالانه ۴۰۰ میلی‌متر و متوسط دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد انجام شد. خاک مزرعه از نوع لوم (بافت متوسط) بود. بر اساس آمار هواشناسی، بیشترین بارندگی در اسفندماه و کمترین تغییرات بارندگی در فروردین‌ماه مشاهده شد. بارندگی انتهایی از عوامل کلیدی تأثیرگذار بر عملکرد مرتع در این منطقه است. آزمایش در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار در محیط آبی اجرا شد. هر کرت آزمایشی شامل چهار خط کاشت با فاصله ۵۰ سانتی‌متر از یکدیگر و طول ۲ متر بود. فاصله بین کرت‌ها ۷۵ سانتی‌متر و فاصله بین تکرارها ۱ متر در نظر گرفته شد. کاشت به صورت خطی و دستی در تاریخ اول آبان‌ماه انجام شد. آبیاری هفتگی و مبارزه با علف‌های هرز به صورت مکانیکی صورت گرفت.

می‌تواند اهداف ارزشمندی برای برنامه‌های اصلاحی پیشرفته فراهم کنند (ابراهیم و همکاران، ۲۰۲۰). تاکنون، تجزیه ارتباط به‌طور موفق برای شناسایی مارکرهای مرتبط با صفات زراعی در گیاهان مختلف استفاده شده و زمینه‌ساز توسعه راهبردهای اصلاحی هدفمند گردیده است (چنگ و همکاران، ۲۰۱۵؛ لیو و همکاران، ۲۰۱۱). در گیاهان علوفه‌ای، تجزیه ارتباط می‌تواند به شناسایی نواحی ژنومی مرتبط با عملکرد علوفه و کیفیت تغذیه‌ای کمک کند، که در نهایت به بهبود برنامه‌های اصلاحی منجر می‌شود (لی و چن، ۲۰۲۳).

هدف این پژوهش، شناسایی نشانگرهای مولکولی ISSR مرتبط با صفات مورفولوژیک و کیفیت علوفه *E. hispidus* var. *villosus* است تا ژنوتیپ‌های برتر برای تولید علوفه پایدار و باکیفیت در مراتع توسعه یابند. این مطالعه با بهره‌گیری از تجزیه ارتباط و ابزارهای مولکولی، به دنبال ارائه راهکارهای نوین برای اصلاح ژنتیکی گیاهان مرتعی و تقویت نظام‌های کشاورزی پایدار در برابر چالش‌های محیطی است.

روش شناسی پژوهش

مواد گیاهی

در این پژوهش، ۲۴ ژنوتیپ از گونه *E. hispidus* var. *villosus* از بانک ژن منابع طبیعی ایران تهیه شد.

جدول ۱. فهرست ۲۴ ژنوتیپ انتخاب شده از بانک ژن منابع طبیعی

Table 1. List of 24 genotypes selected from the Natural Resources Gene Bank

شماره	منطقه	کد بانک ژن	شماره	منطقه	کد بانک ژن
Genotype number	Location/ Region	Accession number	Genotype number	Location/ Region	Accession number
1	چهار تاغ - شهرکرد	۶-۱۰	13	گردنه قوشچی - سلماس	۲ قوشچی
2	پاتاوه - یاسوج	۱۳-۱۳	14	قلعه آرزومند - سمیرم	۱۳-۱
3	فریدن - اصفهان	۴۰-۷	15	قلعه آرزومند - سمیرم	۱۳-۲
4	قلعه آرزومند - سمیرم	۱۳-۳	16	ایستگاه خنا - سمیرم	۱۳-۸
5	سبزکوه - چهارمحال	۷-۱۰	17	میمند - یاسوج	۴-۸
6	ایستگاه البرز - کرج	۱۳-۶	18	فیروزآباد - یاسوج	۸-۶
7	کوه نثار - بیجار	۱ بیجار	19	بیدسیحان - اقلید	۷-۸
8	بید قطار - بروجن	۸-۱۰	20	پاسهلکی - اقلید	۷-۶
9	دجکرد - اقلید	۵-۷	21	دیزین - تهران	۳۱۶
10	سمیرم	۱۳-۱۲	22	اصفهان	۱۶۸
11	چشمه خونی - اصفهان	۱۳-۱۴	23	نور بلده - مازندران	۳۱۳
12	ریمله - خرم‌آباد	۴-۱۱	24	خوش ییلاق - گرگان	۳۱۴

PCR روی ژل آگارز ۱/۵٪ با بافر 1X TBE و ولتاژ ۱۰۰ ولت به مدت ۲ ساعت الکتروفورز شدند. ژل‌ها با محلول اتیدیوم بروماید (۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر) به مدت ۳۰ تا ۴۵ دقیقه رنگ‌آمیزی و با دستگاه Gel Documentation تصویربرداری شدند.

تجزیه و تحلیل داده‌ها

تجزیه واریانس، آزمون چنددامنه‌ای دانکن (سطح احتمال ۵٪) و همبستگی فنوتیپی بین صفات مورفولوژیک و کیفیت علوفه با استفاده از نرم‌افزارهای SPSS و MSTAT-C انجام شد. تجزیه خوشه‌ای (Cluster Analysis) با نرم‌افزار Minitab 16 صورت گرفت. داده‌های مولکولی به صورت صفر برای عدم حضور باند و یک برای حضور باند امتیازدهی شدند. محتوی اطلاعات چند شکلی (PIC) از طریق رابطه (۱) محاسبه شد (هو و همکاران، ۲۰۰۵).

$$PIC = 1 - \sum_{i=1}^n PI^2 \quad \text{رابطه (۱)}$$

همچنین شاخص نشانگری (MI) از رابطه (۲)

بدست آمد (پاول و همکاران، ۱۹۹۶).

$$MI = PIC \times E \quad \text{رابطه (۲)}$$

شاخص نسبت چندگانه موثر (EMR) از رابطه (۳)

(کومار و همکاران، ۲۰۰۹) و قدرت تفکیک (RP) از

رابطه (۴) محاسبه گردید (آلتینتاش و همکاران، ۲۰۰۸).

$$EMR = NPB \times \beta \quad \text{رابطه (۳)}$$

$$RP = \sum IB \quad \text{رابطه (۴)}$$

در پایان نیز با استفاده از نرم‌افزار NTSYS ماتریس تشابه، تجزیه خوشه‌ای و آزمون مانتل مورد ارزیابی قرار گرفت. به منظور شناسایی نشانگرهای مولکولی مرتبط با صفات کمی و کیفی علوفه، از رگرسیون خطی گام‌به‌گام (Stepwise Linear Regression) با استفاده از داده‌های ژنوتیپی حاصل از نشانگرهای ISSR به عنوان متغیر مستقل و داده‌های فنوتیپی به عنوان متغیر وابسته، در محیط نرم‌افزار SPSS استفاده شد.

اندازه‌گیری صفات مورفولوژیک و کیفیت علوفه

صفات مورفولوژیک شامل ارتفاع بوته (PLH)، طول میانگره (INL)، تعداد سنبلچه در سنبله (NSS)، طول برگ پرچم (FLL)، طول خوشه (SPL)، تعداد ساقه در بوته (NSB)، و عملکرد وزن خشک علوفه (DW) اندازه‌گیری شد. این صفات بر روی حداقل پنج بوته به صورت تصادفی از هر کرت انتخاب و پس از میانگین‌گیری ثبت شدند. برای ارزیابی کیفیت علوفه، صفات درصد قابلیت هضم ماده خشک (DMD)، درصد پروتئین خام (CP)، درصد فیبر محلول در شوینده اسیدی (ADF)، درصد خاکستر کل (ASH)، و درصد کربوهیدرات‌های محلول در آب (WSC) با استفاده از دستگاه مادون قرمز نزدیک (NIR) در آزمایشگاه بخش دامپروری مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان کرمانشاه و بر اساس روش ارائه‌شده توسط جعفری و همکاران (۲۰۰۳) اندازه‌گیری شد.

استخراج DNA و تحلیل مولکولی

استخراج DNA از برگ‌های ۲۴ ژنوتیپ به صورت بالک و با استفاده از روش اصلاح‌شده تورس و همکاران (۱۹۹۳) انجام شد. کیفیت و کمیت DNA با استفاده از ژل آگارز ۰/۸٪ بررسی شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) در حجمی معادل ۲۰ میکرولیتر انجام شد. ترکیبات واکنش شامل ۵۰ نانوگرم DNA الگو، ۲ میلی‌مولار $MgCl_2$ ، ۰/۵ میلی‌مولار از هر یک از نوکلئوتیدهای چهارگانه (dNTPs)، ۲ میکرومول از هر پرایمر، یک واحد آنزیم Taq DNA پلیمرز و بافر واکنش در غلظت 1X بود. چرخه حرارتی شامل یک مرحله واسرشت‌سازی اولیه (۹۵ درجه سانتی‌گراد، ۵ دقیقه)، ۳۵ سیکل حرارتی (واسرشت‌سازی: ۹۵ درجه سانتی‌گراد، ۳۰ ثانیه؛ اتصال آغازگر: دمای متفاوت برای هر آغازگر، ۳۰ ثانیه؛ توسعه رشته: ۷۲ درجه سانتی‌گراد، ۶۰ ثانیه) و توسعه نهایی (۷۲ درجه سانتی‌گراد، ۵ دقیقه) بود. محصولات

1 Polymorphic information content

2 Marker Index

3 Effective multiplex ratio

4 Resolving power

یافته‌های پژوهش

مورفولوژیک و کیفیت علوفه

نتایج تجزیه واریانس (جدول ۲) صفات مورفولوژیک و کیفیت علوفه تحت شرایط آبیاری نشان داد که بین ژنوتیپ‌های مورد مطالعه، تفاوت‌های آماری معنی‌داری در صفات ارتفاع بوته، تعداد سنبلیچه در سنبله، طول برگ پرچم و طول خوشه در سطح احتمال ۵ درصد وجود دارد. سایر صفات نیز در سطح احتمال ۱ درصد از تفاوت معنی‌دار برخوردار بودند که بیانگر تنوع ژنتیکی قابل توجه و گسترده‌تر در این صفات است. در مقابل، صفات کیفیت علوفه عموماً فاقد اختلاف معنی‌دار بودند و تنها درصد خاکستر کل به‌عنوان استثنا، تفاوت معنی‌داری در سطح ۵٪ نشان داد. این نتایج مؤید آن است که صفات مورفولوژیک نسبت به صفات کیفیت علوفه از تنوع ژنتیکی بیشتری برخوردار بوده و پتانسیل بالاتری برای انتخاب و اصلاح در برنامه‌های بهبود ژنتیکی دارند. کاهش تنوع در صفات کیفیت علوفه ممکن است ناشی از کنترل ژنتیکی پیچیده‌تر، اثرات محیطی یا محدودیت در تعداد ژنوتیپ‌های بررسی شده باشد. بنابراین، بهره‌برداری مؤثر از تنوع ژنتیکی در صفات کیفیت علوفه مستلزم استفاده از رویکردهای مولکولی و نقشه‌یابی ژنومی جهت کشف نواحی مؤثر بر این صفات و توسعه نشانگرهای مولکولی مرتبط خواهد بود. سیدمحمدی و همکاران (۲۰۱۲) به منظور بررسی تنوع ژنتیکی و روابط عملکرد دانه و اجزای آن، ۳۱ ژنوتیپ از *Ag. desertorum* را در شرایط آب و هوایی شهر اراک مورد بررسی قرار دادند. نتایج تجزیه واریانس نشان داد که بین ژنوتیپ‌ها

اختلافات قابل توجهی در صفات مورد مطالعه وجود دارد

که مبنای مناسبی برای تحلیل‌های بعدی است. مقایسه میانگین ژنوتیپ‌ها برای صفات مورد مطالعه با استفاده از آزمون دانکن در سطح احتمال ۵٪ انجام شد و نتایج آن در جدول ۳ ارائه شده است. همان‌گونه که مشاهده می‌شود، در میان ژنوتیپ‌ها، تنوع در صفات مورفولوژیک نسبت به صفات کیفیت علوفه بیشتر بوده که این یافته با نتایج حاصل از تجزیه واریانس نیز هم‌راستا است. میانگین ارتفاع بوته ژنوتیپ‌های مورد بررسی برابر با ۷۸/۰۴ سانتی‌متر با انحراف معیار ۶/۹۰ بود. ژنوتیپ ۲۴ بیشترین ارتفاع را داشت و در گروه a قرار گرفت، در حالی که ژنوتیپ‌های ۱ و ۲ کمترین ارتفاع را داشته و در گروه e طبقه‌بندی شدند. میانگین طول میانگره برابر با ۱۵/۲۵ سانتی‌متر با انحراف معیار ۲/۲۳ بود. ژنوتیپ‌های ۲۰، ۱۰ و ۱۱ دارای بلندترین و ژنوتیپ‌های ۲ و ۲۲ دارای کوتاه‌ترین طول میانگره بودند. میانگین تعداد سنبلیچه در سنبله ۱۰/۹۳ با انحراف معیار ۱/۵۶ بود. ژنوتیپ‌های ۲۴ و ۱۱ بیشترین تعداد سنبلیچه در سنبله را داشتند و ژنوتیپ ۱۶ کمترین مقدار را نشان داد. میانگین طول برگ پرچم برابر با ۱۱/۲۳ سانتی‌متر با انحراف معیار ۱/۵۳ بود. ژنوتیپ ۲۴ بیشترین و ژنوتیپ ۲۲ کمترین طول برگ پرچم را به خود اختصاص دادند. میانگین طول خوشه ژنوتیپ‌ها ۱۴/۸۹ سانتی‌متر با انحراف معیار ۲/۴۶ بود. ژنوتیپ ۸ دارای بیشترین طول خوشه و در گروه a و ژنوتیپ ۲۲ دارای کمترین مقدار و در گروه e قرار گرفت. میانگین تعداد ساقه در بوته برابر با ۱۸/۲۷ با انحراف معیار ۵/۰۵ بود.

جدول ۲. تجزیه واریانس برای صفات مورفولوژیک و کیفیت علوفه در ژنوتیپ‌های مورد مطالعه

Table 2. Analysis of variance for morphological traits and forage quality in the studied genotypes

S.O.V	df	MS											
		PLH	INL	NSS	FLL	SPL	NSB	DW	DMD	CP	WSC	ADF	ASH
Replication	2	38.488	1.282	0.486	1.39	3.727	32.03	93750.68	16.697	4.287	0.602	9.92	0.947
Genotypes	23	72.201*	18.559**	3.964*	3.498*	9.054*	53.744**	1521738.512**	3.653 ^{ns}	0.731 ^{ns}	0.444 ^{ns}	3.549 ^{ns}	0.378*
Error	46	35.844	6.199	1.79	1.827	4.688	6.847	98343.12	3.985	0.586	0.426	4.367	0.192
CV (%)		7.67%	16.33%	12.24%	12.04%	14.54%	14.32%	10.65%	5.05%	4.99%	17.55%	4.31%	5.19%

***، ** و ns: در سطح احتمال ۱ و ۵ درصد معنی‌دار و عدم وجود اختلاف معنی‌دار

ارتفاع بوته (PLH)، طول میانگره (INL)، تعداد سنبلیچه در سنبله (NSS)، طول برگ پرچم (FLL)، طول خوشه (SPL)، تعداد ساقه در بوته (NSB)، عملکرد وزن خشک علوفه (DW)، درصد قابلیت هضم ماده خشک (DMD)، درصد پروتئین خام (CP)، درصد فیبر محلول در شوینده اسیدی (ADF)، درصد خاکستر کل (ASH) و درصد کربوهیدرات‌های محلول در آب (WSC).

خطاست، در مواردی ممکن است ساختار داده‌ها به گونه‌ای باشد که علی‌رغم وجود تنوع، هم‌پوشانی بین ژنوتیپ‌ها موجب کاهش واریانس بین‌ژنتیکی شده و در نتیجه اثر ژنوتیپ معنی‌دار نشود. از این‌رو، حتی در صورت معنی‌دار نبودن اثر ژنوتیپ در تجزیه واریانس، انجام آزمون مقایسه میانگین می‌تواند وجود تنوع پنهان را آشکار سازد. بر اساس نتایج آزمون دانکن، ژنوتیپ ۴ با ۱۶/۴۶ درصد دارای بیشترین میزان پروتئین خام و ژنوتیپ ۶ با ۱۴/۴۷ درصد دارای کمترین میزان پروتئین خام و میانگین قابلیت هضم ماده خشک ژنوتیپ‌ها برابر با ۳۹/۵۳ درصد و انحراف معیار ۰/۹۲ بود. ژنوتیپ‌های ۲۴، ۱۹، ۱۱ و ۲ با یکدیگر اختلاف معنی‌داری نداشتند و در گروه a قرار گرفتند، در حالی که ژنوتیپ ۲۳ با کمترین مقدار در گروه b طبقه‌بندی شد. میانگین کربوهیدرات‌های محلول در آب ژنوتیپ‌ها ۳/۷۲ درصد با انحراف معیار ۰/۲۲ بود. طبق آزمون دانکن در سطح ۵ درصد، تفاوت معنی‌داری بین ژنوتیپ‌ها برای این صفت مشاهده نشد و همگی در یک گروه قرار گرفتند. میانگین فیبر نامحلول در شوینده اسیدی ژنوتیپ‌ها برابر با ۴۸/۴۴ درصد با انحراف معیار ۰/۹۲ بود. ژنوتیپ ۲۳ با ۵۰/۹۷ درصد دارای بیشترین مقدار بود. ژنوتیپ ۱۹ نیز با قرار گرفتن در گروه b از نظر آماری تفاوت معنی‌داری با سایر ژنوتیپ‌ها نداشت. میانگین خاکستر ژنوتیپ‌ها برابر با ۸/۴۴ درصد با انحراف معیار ۰/۲۳ بود. ژنوتیپ ۱۶ با ۹/۰۶ درصد دارای بیشترین و ژنوتیپ ۲۰ دارای کمترین میزان خاکستر بود. تنوع ژنتیکی محدودتر در صفات کیفیت علوفه نسبت به صفات مورفولوژیک، بیانگر پیچیدگی کنترل ژنتیکی و احتمال تأثیر بیشتر عوامل محیطی بر این دسته از صفات است. هم‌پوشانی ویژگی‌ها میان ژنوتیپ‌ها می‌تواند باعث کاهش واریانس بین‌ژنتیکی شده و به دنبال آن، آزمون‌های سنتی نظیر تجزیه واریانس قادر به شناسایی تفاوت‌های معنادار نباشند. این امر ضرورت استفاده از روش‌های تکمیلی مانند آزمون‌های مقایسه میانگین را در ارزیابی دقیق‌تر تنوع ژنتیکی نشان می‌دهد. همچنین، این وضعیت حاکی از این است که صفات کیفی اغلب تحت کنترل ژن‌های

ژنوتیپ ۲۳ بیشترین تعداد ساقه را داشت و در گروه a قرار گرفت، در حالی که ژنوتیپ ۲۲ کمترین مقدار را نشان داد و در گروه e قرار گرفت. میانگین عملکرد علوفه خشک ژنوتیپ‌های مورد بررسی برابر با ۲۹۴۳ کیلوگرم در هکتار با انحراف معیار ۷۴۷/۸۷ بود. ژنوتیپ‌های ۲۳ و ۱۰ بیشترین عملکرد را داشته و در گروه a قرار گرفتند، در حالی که ژنوتیپ ۷ با کمترین مقدار عملکرد در گروه J طبقه‌بندی شد. نتایج آزمون دانکن نشان‌دهنده وجود تنوع ژنتیکی قابل توجه در صفات مورفولوژیک و عملکردی بود که این تنوع، اساس انتخاب مؤثر و پیشرفت در برنامه‌های اصلاح نباتات را فراهم می‌آورد. صفات مورفولوژیک که به رشد و توسعه گیاه مرتبط هستند، همچون ارتفاع بوته و طول خوشه، نقش کلیدی در تعیین ظرفیت تولید بیوماس و عملکرد علوفه خشک دارند و بنابراین به عنوان شاخص‌های مهم در ارزیابی ژنوتیپ‌ها قابل توجه می‌باشند. تفاوت معنی‌دار بین ژنوتیپ‌ها در این صفات، بیانگر کنترل پلی‌ژنی و تأثیر متقابل ژنتیکی و محیطی است که نیازمند بررسی‌های ژنتیکی عمیق‌تر و استفاده از ابزارهای مولکولی برای کشف نواحی تأثیرگذار ژنومی می‌باشد. این یافته‌ها همسو با مطالعات پیشین تأکید می‌کنند که بهره‌برداری از تنوع ژنتیکی موجود در صفات مورفولوژیک، راهکاری مؤثر برای افزایش عملکرد و بهبود کیفیت علوفه در گونه‌های مرتعی است و نشان‌دهنده ضرورت توسعه برنامه‌های اصلاحی هدفمند مبتنی بر نشانگرهای مولکولی و نقشه‌یابی ژنومی می‌باشد. فرشادفر و فرشادفر (۲۰۰۳) در بررسی تنوع ژنتیکی گونه‌های مختلف *Ag. Gaernt* با استفاده از صفات ریخت‌شناختی و شیمیایی، در صد خاکستر در صفات شیمیایی و طول سنبله و ارتفاع گیاه را در صفات ریخت‌شناختی به عنوان متنوع‌ترین صفات معرفی نمودند و در پایان جمعیت‌های برتر را با توجه به مقایسه میانگین صفات معرفی نمودند.

در صفات کیفیت علوفه، تنوع مشاهده‌شده در بین ژنوتیپ‌ها نسبت به صفات مورفولوژیک کمتر بود. در این زمینه، کاکران و کاکس (۱۹۵۷) اشاره کرده‌اند که چون آزمون F حاصل تقسیم واریانس ژنوتیپ‌ها بر واریانس

متعدد با اثرات کوچک قرار دارند که شناسایی و بهره‌برداری از آن‌ها نیازمند رویکردهای پیشرفته مولکولی و نقشه‌یابی ژنومی است. بنابراین، برای بهبود و اصلاح این صفات، روش‌های مبتنی بر نشانگرهای مولکولی و تحلیل ژنومی می‌تواند نقش کلیدی در کشف منابع نهفته تنوع ژنتیکی و افزایش کارایی برنامه‌های اصلاحی ایفا کند. رحمانی و همکاران (۲۰۰۶) به بررسی عملکرد و کیفیت علوفه ۱۸ رقم و اکوتیپ *Ag. cristatum* L. پرداختند. نتایج بررسی اختلاف میان اکوتیپ‌ها برای عملکرد علوفه و درصد قابلیت هضم معنی‌دار بود. ایشان همچنین درصد پروتئین خام را در شرایط آبی برای جمعیت‌های مورد بررسی بیشتر گزارش کردند.

به‌منظور بررسی ارتباط میان صفات مورفولوژیک و کیفیت علوفه جهت شناسایی ژنوتیپ‌های مطلوب با تأکید بر عملکرد خشک و کیفیت علوفه، ضریب همبستگی فنوتیپی بین صفات مختلف محاسبه شد. نتایج این تجزیه در جدول (۴) ارائه شده است. بین عملکرد خشک علوفه با صفات ارتفاع گیاه، طول میان‌گره و طول

برگ پرچم، همبستگی مثبت و معنی‌داری در سطح احتمال ۵٪ مشاهده شد. همچنین، بین عملکرد خشک علوفه و تعداد ساقه در بوته، همبستگی مثبت و معنی‌داری در سطح احتمال ۱٪ به‌دست آمد. در مقابل، برخی صفات کیفیت علوفه با عملکرد خشک علوفه رابطه منفی نشان دادند، اما این روابط از نظر آماری معنی‌دار نبودند. تنها صفات خاکستر و فیبر محلول در شوینده اسیدی، همبستگی مثبت (و در عین حال غیرمعنی‌دار) با عملکرد علوفه خشک داشتند. نتایج ضریب همبستگی فنوتیپی بین صفات مورفولوژیک، کیفیت و عملکرد خشک علوفه نشان‌دهنده وجود روابط معنی‌دار مثبت بین عملکرد و برخی صفات مورفولوژیک کلیدی است که به رشد و توسعه گیاه مرتبط هستند. این روابط مثبت تأکید می‌کند که صفاتی مانند ارتفاع گیاه، طول میان‌گره، طول برگ پرچم و تعداد ساقه در بوته می‌توانند به‌عنوان شاخص‌های پیش‌بینی عملکرد علوفه خشک مورد توجه قرار گیرند و در انتخاب ژنوتیپ‌های برتر برای برنامه‌های اصلاحی نقش مؤثری ایفا کنند.

جدول ۳. مقایسه میانگین صفات مورفولوژیک و کیفیت علوفه در ژنوتیپ‌های مورد مطالعه به روش دانکن در سطح ۵ درصد

Table 3. Comparison of mean morphological traits and forage quality in the studied genotypes using Duncan's method at the 5% level.

Genotype	PLH	INL	NSS	FLL	SPL	NSB	DW	DMD	CP	WSC	ASH	ADF
1	69.01e	16.70a-f	11.00a-f	11.11a-e	15.21a-e	20.47b	2636fgh	40.89a	14.91bc	46.93ab	8.27a-e	46.93ab
2	69.01e	11.43g	9.973b-f	10.38b-e	13.01a-e	17.53b-e	2693efg	37.93ab	15.42abc	50.13ab	8.30a-e	50.13ab
3	73.24cde	17.02a-d	11.20a-f	11.99a-d	16.89ab	18.27bcd	2995def	38.39ab	15.47abc	50.06ab	8.94abc	50.06ab
4	79.03b-e	15.39a-g	11.27a-f	11.40a-e	15.75a-e	17.13b-e	2762def	39.52ab	16.46a	48.93ab	8.46a-e	48.93ab
5	80.61a-e	14.82a-g	11.27a-f	11.39a-e	15.27a-e	20.27b	3590bc	40.54ab	15.16abc	47.31ab	8.73a-d	47.31ab
6	77.91b-e	12.99b-g	11.33a-e	10.22b-e	12.22de	15.53b-e	2097hi	39.40ab	14.47c	48.16ab	8.05de	48.16ab
7	74.07cde	14.63a-g	11.10a-f	11.35a-e	17.14ab	14.80cde	1430j	39.12ab	15.28abc	48.79ab	8.49a-e	48.79ab
8	78.05b-e	17.61ab	12.60ab	12.25abc	17.27a	15.67b-e	2794def	39.57ab	15.64abc	48.94ab	8.98ab	48.94ab
9	72.41cde	12.43c-g	10.60a-f	9.81cde	12.29cde	16.67b-e	2977def	39.49ab	15.68abc	48.61ab	8.67a-d	48.61ab
10	86.71ab	18.89a	11.47a-d	12.83ab	15.67a-e	19.67b-e	4556a	40.96a	15.56abc	47.32ab	8.88a-d	47.32ab
11	77.92b-e	18.61a	12.67a	11.49a-e	16.95ab	17.33b-e	3708b	38.97ab	14.81bc	48.67ab	8.50a-e	48.67ab
12	78.89b-e	12.40d-g	10.27a-f	10.53a-e	13.52a-e	17.33b-e	2925def	39.13ab	15.41abc	48.70ab	8.07cde	48.70ab
13	74.03cde	14.18a-g	8.800ef	9.457de	15.47a-e	19.00bcd	3356bcd	40.24ab	15.39abc	47.77ab	8.29a-e	47.77ab
14	77.85b-e	16.97a-d	10.40a-f	12.86ab	16.33a-d	18.67bcd	3294bcde	39.15ab	15.67abc	48.68ab	8.18b-e	48.68ab
15	84.01abc	17.62ab	11.20a-f	11.81a-d	13.90a-e	14.67de	3365bcd	38.83ab	14.80bc	49.25ab	8.65a-d	49.25ab
16	78.36b-e	12.87b-g	8.667f	10.77a-e	12.87b-e	17.80b-e	2545f-i	40.45ab	15.47abc	47.42ab	9.06a	47.42ab
17	78.78b-e	12.10efg	9.867c-f	10.71a-e	13.29a-e	15.80b-e	3049c-f	38.46 b	15.04abc	49.44ab	8.32a-e	49.44ab
18	80.31a-e	17.17a-d	9.467def	10.49a-e	13.81a-e	20.53b	2160ghi	39.28ab	16.03ab	48.79ab	8.28a-e	48.79ab
19	78.27b-e	11.92fg	10.51a-f	11.39a-e	14.53a-e	17.73b-e	2001i	41.17a	14.96bc	46.53b	8.43a-e	46.53b
20	79.30b-e	18.66a	11.67a-d	11.27a-e	16.94ab	16.07b-e	2772def	38.49ab	14.79bc	48.58ab	7.73e	48.58ab
21	78.00b-e	15.59a-g	12.27abc	11.48a-e	14.98a-e	19.93bc	2753def	40.34ab	14.71bc	47.39ab	8.03de	39.47ab
22	70.99de	11.78g	9.733c-f	8.827e	11.67e	12.97e	2602fgh	40.74ab	16.14ab	47.40ab	8.11b-e	40.47ab
23	82.06a-d	17.30abc	12.20abc	12.47abc	15.76a-e	35.80a	4525a	36.79b	14.94bc	50.97a	8.19a-e	50.97a
24	90.71a	16.83a-e	12.80a	13.15a	16.57abc	18.87bcd	3054c-f	40.93a	15.76abc	47.72ab	8.96ab	47.72ab

ارتفاع بوته (PLH)، طول میانگره (INL)، تعداد سنبله در سنبله (NSS)، طول برگ پرچم (FLL)، طول خوشه (SPL)، تعداد ساقه در بوته (NSB)، عملکرد وزن خشک علوفه (DW)، درصد قابلیت هضم ماده خشک (DMD)، درصد پروتئین خام (CP)، درصد فیبر محلول در شوینده اسیدی (ADF)، درصد خاکستر کل (ASH) و درصد کربوهیدرات‌های محلول در آب (WSC).

جدول ۴. همبستگی صفات مورفولوژیک و کیفیت علوفه

Table 4. Correlation between morphological traits and forage quality

صفات	PLH	INL	NSS	FLL	SPL	NSB	DW	DMD	CP	WSC	ADF
INL	.436*										
NSS	.410*	.604**									
FLL	.640**	.691**	.657**								
SPL	.248	.740**	.594**	.707**							
NSB	.239	.293	.211	.362	.212						
DW	.423*	.456*	.285	.407*	.220	.544**					
DMD	.065	-.124	-.107	-.076	-.096	-.331	-.186				
CP	-.017	-.088	-.289	-.084	-.047	-.145	-.057	.185			
WSC	.057	-.130	.110	-.157	-.085	-.243	-.395	-.078	-.506*		
ADF	-.010	.143	.128	.147	.128	.306	.220	-.951**	.032	-.099	
ASH	.285	.154	.116	.383	.199	-.072	.177	.275	.302	-.226	-.060

** و *: اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۱ و ۵ درصد.

ارتفاع بوته (PLH)، طول میانگره (INL)، تعداد سنبلچه در سنبله (NSS)، طول برگ پرچم (FLL)، طول خوشه (SPL)، تعداد ساقه در بوته (NSB)، عملکرد وزن خشک علوفه (DW)، درصد قابلیت هضم ماده خشک (DMD)، درصد پروتئین خام (CP)، درصد فیبر محلول در شوینده اسیدی (ADF)، درصد خاکستر کل (ASH) و درصد کربوهیدرات‌های محلول در آب (WSC).

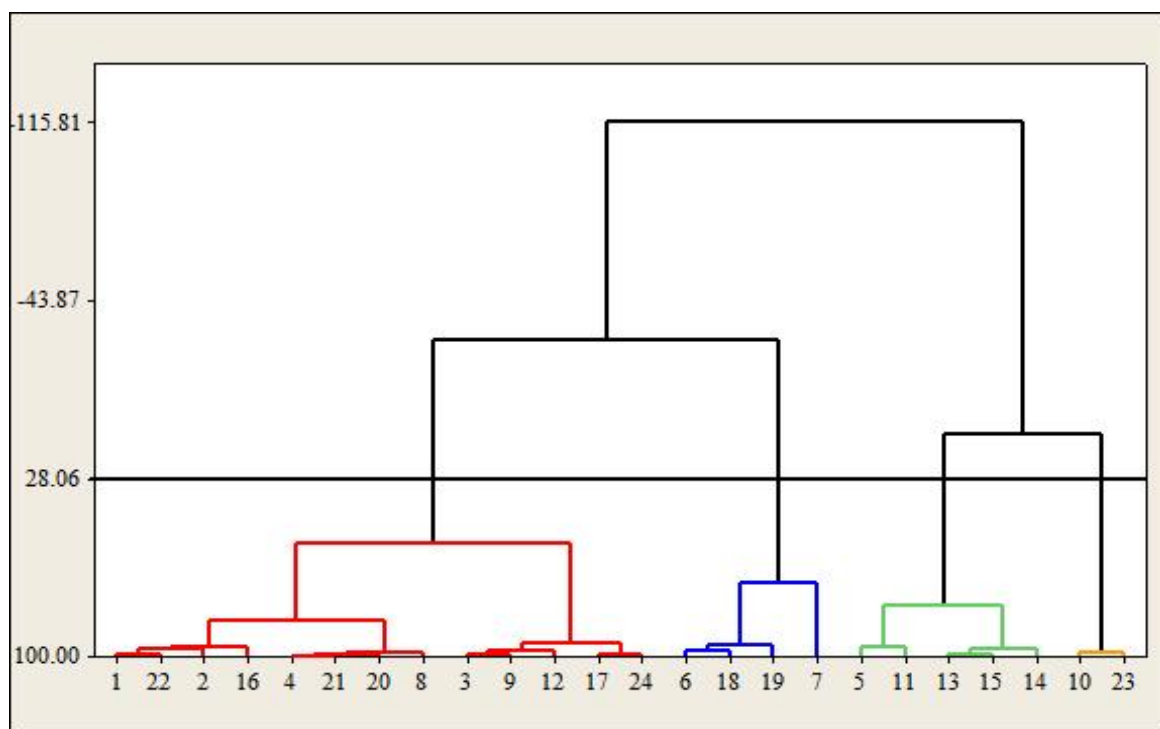
تجزیه خوشه‌ای ژنوتیپ‌ها بر اساس میانگین صفات مورفولوژیک و کیفیت علوفه با استفاده از روش UPGMA، تفکیک واضحی را در قالب چهار خوشه متمایز نشان داد. خوشه چهارم شامل ژنوتیپ‌های ۲۳ و ۱۰ بود که بر اساس معیارهای عملکرد خشک علوفه و سایر صفات مورفولوژیک، در صدر قرار داشتند و به‌عنوان منابع ارزشمند تنوع ژنتیکی با صفات مطلوب شناخته شدند. این امر نشان‌دهنده پتانسیل بالای این ژنوتیپ‌ها برای استفاده در برنامه‌های اصلاحی به منظور افزایش بهره‌وری و کیفیت علوفه است. در مقابل، خوشه سوم که شامل ژنوتیپ‌های ۷، ۱۹، ۱۶ و ۶ بود، از نظر عملکرد و اغلب صفات مورفولوژیک در سطوح پایین‌تری قرار داشت و احتمالاً نشان‌دهنده گروهی با ظرفیت محدودتر در تولید و رشد می‌باشد که در برنامه‌های اصلاحی نیازمند توجه کمتر یا بررسی‌های تکمیلی است. خوشه دوم متشکل از ژنوتیپ‌هایی است که پس از خوشه چهارم، از نظر بیشتر صفات در جایگاه بالاتری قرار داشتند و می‌توانند به‌عنوان کاندیداهای مناسبی برای انتخاب و ترکیب در برنامه‌های بهبود معرفی شوند. خوشه اول نیز شامل ژنوتیپ‌هایی بود که نسبت به خوشه دوم، در اکثر صفات در جایگاه پایین‌تری قرار گرفتند و نمایانگر تنوع فوتوتیپی متوسط تا پایین در این جمعیت می‌باشند (شکل ۱). این الگوی خوشه‌ای نمایانگر ساختار ژنتیکی پیچیده و چندوجهی ژنوتیپ‌های مورد مطالعه است و اهمیت کاربرد روش‌های آماری چندمتغیره نظیر تجزیه خوشه‌ای را در

از سوی دیگر، عدم وجود همبستگی معنی‌دار بین صفات کیفیت و عملکرد خشک علوفه نشان می‌دهد که این صفات ممکن است تحت کنترل مکانیسم‌های ژنتیکی و محیطی متفاوتی باشند و تأثیر آن‌ها بر عملکرد کلی گیاه پیچیده‌تر باشد. به‌ویژه، ارتباط غیرمعنی‌دار مثبت صفات خاکستر و فیبر محلول در شوینده اسیدی با عملکرد خشک علوفه، می‌تواند نشان‌دهنده اثرات محدود این عوامل بر تولید بیوماس باشد. این یافته‌ها بر اهمیت تمرکز بر صفات مورفولوژیک در فرآیند انتخاب و اصلاح تأکید دارد. رحمانی و همکاران (۲۰۰۹) در بررسی عملکرد بذر و علوفه اکسشن‌های *Ag. cristatum* بین کلیه صفات در شرایط دیم و آبی تنوع معنی‌داری را مشاهده کرده و رابطه بین عملکرد علوفه خشک با صفات تاریخ سنبله دهی، تاریخ گرده افشانی، تاریخ شیری شدن و رسیدن بذر، منفی و معنی‌دار گزارش کردند. محمدی و همکاران (۲۰۰۶)، به بررسی تنوع ژنتیکی موجود بین ۲۳ جمعیت مختلف گونه *Ag. elongatum* بر اساس صفات مورفولوژیک پرداختند. بر اساس نتایج بدست آمده صفات عملکرد علوفه خشک و تعداد ساقه در گیاه را به عنوان مهمترین فاکتورهای تأثیرگذار در تنوع مورفولوژیکی معرفی و همبستگی مثبت و معنی‌داری بین تمامی صفات با استثناء صفات طول خوشه و طول برگ پرچم با عملکرد خشک علوفه گزارش نمودند.

مولکولی

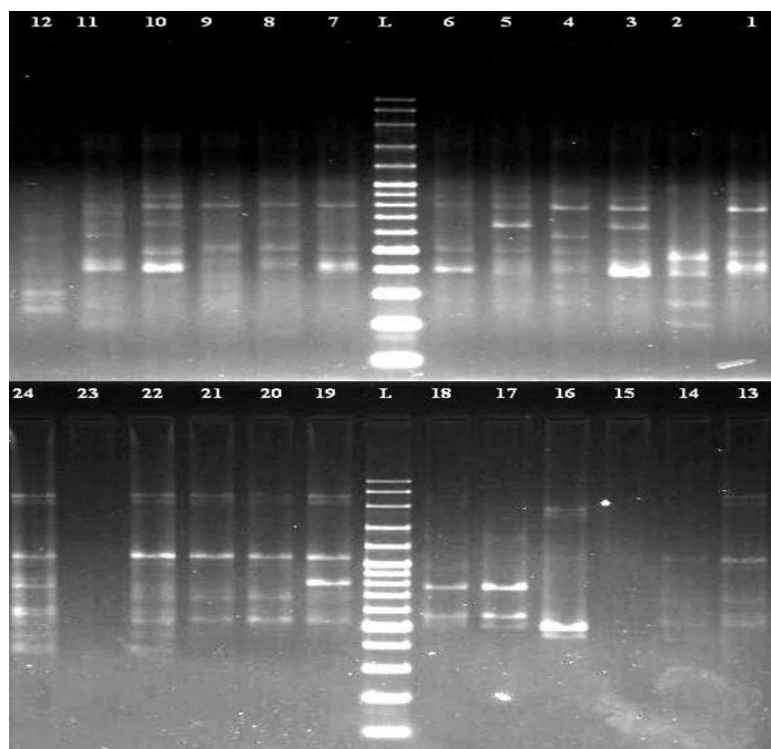
تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های آگروپیرون مورد مطالعه با استفاده از ۲۰ آغازگر ISSR مورد بررسی قرار گرفت که از این ۲۰ آغازگر تنها ۱۳ عدد دارای باندهای قابل امتیاز دهی بودند. آغازگرهای ISSR در مجموع توانستند ۸۹ مکان ژنی را شناسایی کنند که از این تعداد تنها ۲ باند یک شکل مشاهده شد و سایر باندها چند شکل بودند، که آغازگر IS11 بیشترین تعداد باند (۱۴) و آغازگر ۸۴۲ کمترین تعداد باند (۲) را نشان دادند (شکل ۲). در مطالعه‌ای که توسط مرادی و همکاران (۲۰۱۵) انجام شد، تنوع ژنتیکی میان ۱۳ ژنوتیپ از گونه *Ag. cristatum* با استفاده از نشانگرهای ISSR مورد بررسی قرار گرفت. از مجموع ۶۵ باند تکثیرشده توسط ۱۲ پرایمر، ۶۰ باند چندشکلی (با دامنه درصد چندشکلی ۶۰ تا ۱۰۰) بودند که نشان‌دهنده تنوع ژنتیکی قابل توجه درون‌گونه‌ای بود. تجزیه خوشه‌ای بر اساس ضریب دایس، ژنوتیپ‌ها را به چهار گروه ژنتیکی متمایز تقسیم کرد و بای‌پلات نیز این نتایج را تأیید نمود.

شناسایی گروه‌های ژنوتیپی با ویژگی‌های فنوتیپی مشابه و تسهیل فرآیند انتخاب ژنوتیپ‌های برتر در برنامه‌های اصلاحی برجسته می‌سازد. به‌طور خاص، شناخت خوشه‌هایی با صفات برتر می‌تواند به بهینه‌سازی منابع اصلاحی، کاهش هزینه‌ها و افزایش سرعت پیشرفت اصلاحات کمک کند. بنابراین، بهره‌گیری از تجزیه خوشه‌ای به‌عنوان ابزاری کلیدی در طراحی برنامه‌های اصلاحی و مدیریت تنوع ژنتیکی، نقش تعیین‌کننده‌ای در توسعه پایدار گونه‌های مرتعی خواهد داشت. صفری و همکاران (۲۰۱۷) با بررسی ۱۱ اکسشن از گونه *Ag. intermedium* تنوع مورفولوژیکی قابل توجهی را میان اکسشن‌ها گزارش کردند. تجزیه واریانس صفات مورفولوژیکی تفاوت‌های معناداری را میان اکسشن‌ها نشان داد و تجزیه خوشه‌ای، اکسشن‌ها را به سه گروه متمایز تقسیم نمود. همچنین، اکسشن‌های ۴-۸۹۰ و ۱۳-۸۹۰ بیشترین میزان تولید علوفه خشک را داشتند که می‌تواند به عنوان منبعی ارزشمند در برنامه‌های اصلاحی مورد استفاده قرار گیرد.



شکل ۱. دندروگرام تجزیه کلاستر صفات مورفولوژیک و کیفیت علوفه برای ژنوتیپ‌های مورد مطالعه با استفاده از روش UPGMA

Figure 1. Dendrogram of cluster analysis of morphological traits and forage quality for the studied genotypes using the UPGMA method



شکل ۲. الگوی باندی ۲۴ ژنوتیپ مورد مطالعه با استفاده از آغازگر IS6
Figure 2. Banding pattern of the 24 genotypes studied using the IS6 primer

کمترین میزان درصد چند شکلی را آغازگرهای UBC840 (۸۵/۷۱) و UBC884 (۸۷/۵) داشتند و درصد چند شکلی برای سایر آغازگرها ۱۰۰٪ می‌باشد، همچنین میانگین درصد چند شکلی برابر ۹۷/۹۴٪ بود. متوسط تعداد باندهای تولیدشده توسط هر آغازگر برای ۲۴ ژنوتیپ برابر ۶/۹۲ بدست آمد، نتایج بدست آمده برای آغازگرهای استفاده شده در جدول (۵) نشان داده شده است. بیشترین مقدار شاخص EMR متعلق به نشانگر IS11 با مقدار ۱۴ بود و کمترین مقدار مربوط به نشانگر UBC811 با مقدار ۴ است. شاخص PIC بیشترین مقدار خود را در نشانگر UBC842 با ۰/۴۹۱ و کمترین مقدار را در نشانگر UBC811 با ۰/۲۵۹ نشان داد. در شاخص MI، بیشترین مقدار مربوط به نشانگر IS11 با ۵/۰۴۹ و کمترین مقدار مربوط به نشانگر UBC811 با ۱/۰۳۵ بود. شاخص RP بیشترین مقدار را در نشانگر UBC884 با ۵/۹۱۷ و کمترین مقدار را در نشانگر UBC823 با ۲/۷۵۰ داشت. فرشادفر و همکاران (۲۰۱۸) به منظور ارزیابی تنوع ژنتیکی در ۱۳ ژنوتیپ

Ag. desertorum از ۱۵ پرایمر ISSR استفاده کردند که از این میان، ۱۲ پرایمر باندهای قابل تجزیه تولید کردند. در مجموع ۶۱ باند حاصل شد که ۶۰ مورد آن چندشکلی بودند و شاخص PIC از ۰/۲۷ تا ۰/۴۴ متغیر بود. پرایمر IS3 با بالاترین مقدار PIC (۰/۴۴) کارایی بالایی در تفکیک ژنوتیپ‌ها داشت، در حالی که IS9 ضعیف‌ترین قدرت تمایز را نشان داد. نتایج RP، MI و EMR نیز نشان دادند که پرایمرهای IS5، IS11 و IS13 بهترین توانایی را در آشکارسازی تنوع ژنتیکی دارند. تنوع ژنتیکی در جمعیت‌های گیاهی معمولاً با استفاده از شاخص‌های مولکولی متعددی ارزیابی می‌شود که هر یک از این شاخص‌ها جنبه‌های متفاوتی از تنوع و کارایی نشانگرها را بازتاب می‌دهند. درصد پلی‌مورفیسم به عنوان معیاری کلیدی، بیانگر میزان تنوع در میان نمونه‌هاست و مقادیر بالای آن نشان‌دهنده گستردگی تنوع ژنتیکی است که برای برنامه‌های اصلاحی و حفظ منابع ژنتیکی اهمیت زیادی دارد.

جدول ۵. پارامترهای مولکولی محاسبه شده در آغازگرهای ISSR

Table 5. Molecular parameters calculated in ISSR primers

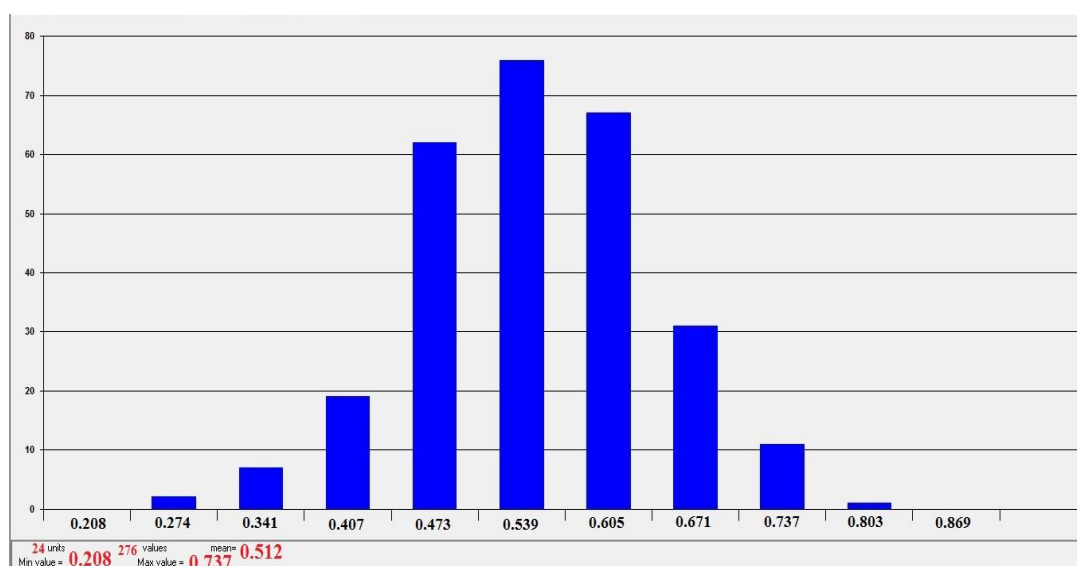
آغازگر Primers	توالی آغازگر Primer sequence	Na	NPB	PP%	EMR	PIC	MI	RP
IS6	5'-CACACACACACACAG-3'	7	7	100	7	0.372	2.601	4.583
UBC884	5'-AGAGAGAGAGAGAG-3'	8	7	87.50	7	0.370	2.592	5.917
IS11	5'-ACACACACACACACC-3'	14	14	100	14	0.361	5.049	9.167
SI14	5'-GACAGACAGACAGACA-3'	10	10	100	10	0.401	4.014	7.000
UBC808	5'-AGAGAGAGAGAGAGAGC-3'	7	7	100	7	0.467	3.267	5.917
UBC811	5'-GAGAGAGAGAGAGAGAC-3'	4	4	100	4	0.259	1.035	3.667
UBC823	5'-TCTCTCTCTCTCTCC-3'	6	6	100	6	0.299	1.795	2.750
UBC825	5'-ACACACACACACACAG-3'	6	6	100	6	0.353	2.118	4.000
UBC886	5'-CTCTCTCTCTCTCTCC-3'	6	6	100	6	0.418	2.507	4.333
UBC880	5'-GGAGAGAGAGAGAGAGA-3'	5	5	100	5	0.347	1.733	3.583
UBC840	5'-GAGAGAGAGAGAGAGA-3'	7	6	85.71	6	0.367	2.199	6.250
UBC835	5'-AGAGAGAGAGAGAGAG-3'	7	7	100	7	0.397	2.781	6.083
UBC842	5'-GAGAGAGAGAGAGAGAT-3'	2	2	100	2	0.491	0.983	1.917
میانگین		6.846	6.692	97.940	6.692	0.377	2.513	5.013

تعداد باند (Na)، تعداد باند چند شکل (NPB)، درصد چند شکلی (PP%)، محتوای اطلاعات چند شکلی (PIC)، شاخص نشانگری (MI)، نسبت چندگانه موثر (EMR) و شاخص قدرت تفکیک (RP).

بهتری در بررسی تنوع ژنتیکی داشتند؛ از مجموع ۷۳ باند، ۷۰ باند چندشکلی بودند و درصد چندشکلی به ۹۶/۲۵٪ رسید. گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها بر اساس داده‌های ISSR کاملاً با توزیع جغرافیایی آن‌ها هماهنگ بود.

فاصله ژنتیکی میان ژنوتیپ‌های مورد مطالعه، با استفاده از ضریب دایس، در بازه‌ای وسیع از ۰/۲۰۸ تا ۰/۷۳۷ متغیر بود و میانگین این فاصله برابر با ۰/۵۱۲ گزارش شد (شکل ۳). این مقادیر نشان‌دهنده میزان پایین شباهت ژنتیکی و در نتیجه تنوع ژنتیکی بالای ژنوتیپ‌های مورد مطالعه است. شناسایی ژنوتیپ‌های دارای بیشترین شباهت (ژنوتیپ‌های ۲۱ و ۲۲ از گروه اول) و کمترین شباهت (ژنوتیپ ۱ از گروه اول و ژنوتیپ ۱۳ از گروه سوم) بیانگر وجود ساختار ژنتیکی پیچیده و متنوع در جمعیت مورد مطالعه است. این گستردگی در فاصله‌های ژنتیکی نشان‌دهنده تفاوت‌های قابل توجه در ترکیب ژنتیکی بین ژنوتیپ‌هاست که اهمیت بالایی در حفظ منابع ژنتیکی و بهره‌برداری بهینه در برنامه‌های اصلاحی دارد. تشخیص نمونه‌هایی با شباهت‌های ژنتیکی متفاوت، امکان شناسایی منابع ژنتیکی منحصر به فرد و گروه‌هایی با ویژگی‌های مشترک را فراهم می‌کند، که این امر زمینه را برای انتخاب هدفمند ژنوتیپ‌های دارای خصوصیات مطلوب و افزایش کارایی برنامه‌های اصلاحی فراهم می‌سازد.

همچنین، شاخص‌هایی مانند EMR، PIC، MI و RP هر کدام نقش ویژه‌ای در تعیین قدرت تفکیک و توانایی اطلاعاتی نشانگرها ایفا می‌کنند. شاخص EMR نشان‌دهنده تعداد لوکوس‌های چندشکل قابل شناسایی توسط هر نشانگر است و مقادیر بالای آن نشانگر کارایی بالاتر در کشف تنوع ژنتیکی می‌باشد. شاخص PIC میزان اطلاعات ژنتیکی قابل استخراج از هر نشانگر را منعکس می‌کند و می‌تواند در انتخاب نشانگرهای مناسب برای مطالعات ژنتیکی مورد استفاده قرار گیرد. شاخص MI که ترکیبی از EMR و PIC است، معیار جامعی برای سنجش توان اطلاعاتی کلی نشانگرها فراهم می‌آورد، و شاخص RP بیانگر قدرت تفکیک نشانگرها در تمایز ژنوتیپ‌ها است. بهره‌گیری از نشانگرهایی با مقادیر بالای این شاخص‌ها می‌تواند به بهبود دقت تحلیل‌های ژنتیکی و افزایش کارایی برنامه‌های اصلاحی منجر شود. به طور کلی، انتخاب آغازگرهای مولکولی با کارایی بالا، نقش مهمی در موفقیت مطالعات تنوع ژنتیکی و توسعه استراتژی‌های بهینه در بهبود گیاهان ایفا می‌کند و می‌تواند به عنوان پایه‌ای مستحکم برای مدیریت منابع ژنتیکی و ارتقای کیفیت و عملکرد گونه‌های گیاهی مطرح گردد. صفری و همکاران (۲۰۲۲) به بررسی اثربخشی نشانگرهای ISSR و پروتئین‌های محلول برگ در ارزیابی تنوع ژنتیکی ۱۲ ژنوتیپ *Ag. elongatum* پرداختند. نتایج نشان داد که نشانگرهای ISSR عملکرد



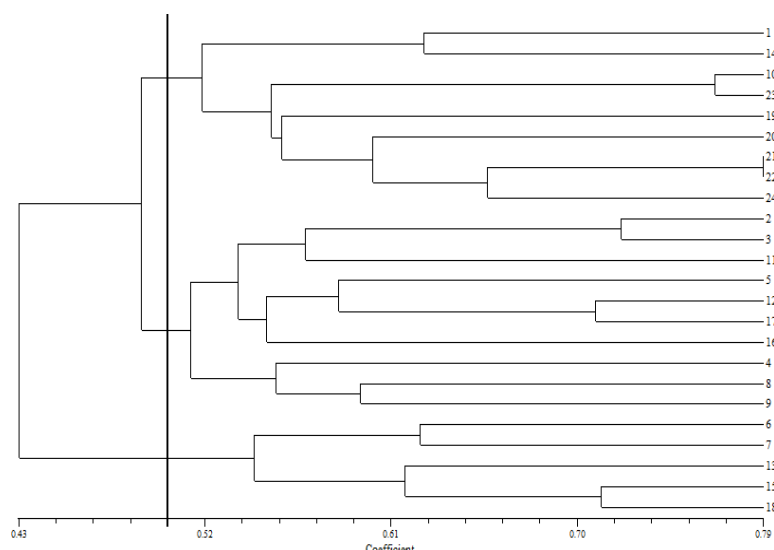
شکل ۳. نمودار توزیع فراوانی فواصل ژنتیکی بین ژنوتیپ‌های مورد مطالعه
Figure 3. Frequency distribution diagram of genetic distances between the studied genotypes

ژنوتیپ‌های ۱۷ و ۸ کمترین تشابه و ژنوتیپ‌های ۲ و ۳ بیشترین تشابه را با یکدیگر داشتند. گروه سوم شامل ژنوتیپ‌های (۶، ۷، ۱۳، ۱۵ و ۱۸) می‌باشد. میانگین تشابه در این گروه ۰/۵۷ بود که در بین ژنوتیپ‌های این گروه ژنوتیپ‌های ۷ و ۱۸ دارای بیشترین تشابه و ژنوتیپ‌های ۷ و ۱۳ دارای کمترین تشابه می‌باشند. صفری و همکاران (۲۰۲۲) تنوع ژنتیکی ۱۳ ژنوتیپ *Ag. intermedium* را با استفاده از نشانگرهای ISSR و پروتئین‌های محلول برگ مورد بررسی قرار دادند. از ۱۵ پرایمر ISSR، ۱۲ پرایمر قابلیت امتیازدهی داشتند و در مجموع ۶۱ باند حاصل شد که ۶۰ مورد آن چندشکلی بود. خوشه‌ای بر اساس ضریب دایس، ژنوتیپ‌ها را به چهار گروه متمایز تقسیم کرد. این تحقیق نشان داد که نشانگرهای ISSR ابزارهای مؤثری برای ارزیابی تنوع ژنتیکی در گونه‌های *Agropyron* هستند.

گزارش‌های متناقضی درباره وجود یا عدم وجود رابطه بین نتایج حاصل از نشانگرهای مولکولی و داده‌های مورفولوژیکی ارائه شده است. نتایج آزمون مانتل نشان داد که همبستگی بین ماتریس‌های تشابه صفات مورفولوژیک و نشانگرهای مولکولی ۳۴٪ و غیرمعنی‌دار بود. همچنین، همبستگی بین صفات کیفیت علوفه و نشانگرهای مولکولی ۱۵٪ و غیرمعنی‌دار گزارش شد.

در نهایت، فهم دقیق ساختار جمعیتی و الگوی فاصله‌های ژنتیکی به برنامه‌ریزان اصلاح نباتات کمک می‌کند تا با اتخاذ رویکردهای هدفمند، حفظ تنوع ژنتیکی را تضمین کرده و از طریق به‌کارگیری ژنوتیپ‌های متنوع، استراتژی‌های مؤثری جهت بهبود عملکرد و سازگاری گیاهان توسعه دهند. آینه‌کوا و همکاران (۲۰۲۳) با استفاده از هفت پرایمر ISSR، تنوع ژنتیکی و روابط خویشاوندی پنج گونه *Agropyron* را در جنوب‌شرقی قزاقستان بررسی کردند. ماتریس تشابه حاصل نشان داد که ISSRها ابزار مؤثری برای تعیین پلی‌مورفیسم و تفکیک گونه‌ها هستند.

دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای به روش UPGMA بر اساس ضریب تشابه دایس در شکل (۴) آمده است. خط برش دندروگرام از محل فاصله ژنتیکی ۰/۵۰ باعث گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها در ۳ گروه گردید. که گروه اول شامل ژنوتیپ‌های (۱، ۱۴، ۱۰، ۲۳، ۱۹، ۲۰، ۲۱، ۲۲ و ۲۴) می‌باشد. میانگین تشابه ژنوتیپ‌های این گروه برابر ۰/۵۶ می‌باشد که در بین ژنوتیپ‌های این گروه، ژنوتیپ‌های ۲۱ و ۲۲ دارای بیشترین تشابه و ژنوتیپ‌های ۲۳ و ۲۰ دارای کمترین تشابه بودند. در گروه دوم ژنوتیپ‌های (۲، ۳، ۱۱، ۵، ۱۲، ۱۷، ۱۶، ۴ و ۸) قرار گرفتند. میانگین تشابه این گروه ۰/۵۴، که



شکل ۴. دندروگرام حاصل از داده‌های نشانگر ISSR برای ژنوتیپ‌های مورد مطالعه
Figure 4. Dendrogram obtained from ISSR marker data for the studied genotypes.

مورفولوژیکی و کیفیت علوفه در گونه *E. hispidus* var. *villosus*، از تجزیه رگرسیون گام به گام استفاده شد. نتایج این تجزیه نشان داد که برخی از نشانگرها دارای ضریب تعیین تعدیل شده بالا و سطح معنی داری قابل توجهی هستند و ارتباط چشمگیری با صفات مورد بررسی دارند. بررسی فراوانی تکرار نشانگرهای ISSR در صفات مختلف نشان داد که برخی از آن‌ها نقش کلیدی و چندمنظوره‌ای در کنترل ویژگی‌های *E. hispidus* var. *villosus* ایفا می‌کنند. از مجموع ۱۳ نشانگر ISSR مورد استفاده، تعداد ۱۲ نشانگر با حداقل یکی از صفات مورفولوژیکی و کیفیت علوفه بررسی شده ارتباط آماری معنی دار نشان دادند. این موضوع بیانگر کارایی بالای نشانگرهای به کاررفته در آشکارسازی نواحی ژنومی مؤثر بر صفات مختلف در گونه *E. hispidus* var. *villosus* است. تنها یک نشانگر فاقد ارتباط معنی دار با صفات بود که ممکن است ناشی از عدم هم‌پوشانی آن با نواحی ژنی مرتبط یا محدودیت‌های آماری در شرایط آزمایشی باشد. در این میان، نشانگر IS11 با ارتباط معنی دار آماری با هفت صفت شامل ارتفاع بوته، تعداد ساقه در بوته، عملکرد وزن خشک علوفه، درصد قابلیت هضم ماده خشک، درصد پروتئین خام، درصد فیبر محلول در شوینده اسیدی و درصد خاکستر کل، بیشترین فراوانی را به خود اختصاص داد و به عنوان نشانگری با پتانسیل بالا برای

با توجه به اینکه صفات ریخت‌شناسی معمولاً مربوط به بخش‌های رمزکننده ژنوم هستند، در حالی که قطعات DNA تکثیر شده توسط نشانگرهای ISSR هم شامل بخش‌های رمزکننده و هم بخش‌های غیررمزکننده ژنوم می‌شوند، و از سوی دیگر، صفات ریخت‌شناسی تحت تأثیر شرایط محیطی نیز قرار دارند، بنابراین عدم وجود همبستگی بالا بین نشانگرهای مولکولی ISSR و صفات مورفولوژیکی و کیفیت علوفه چندان غیرمنتظره نیست. از جمله عوامل احتمالی این مسئله می‌توان به موارد زیر اشاره کرد: اول، با توجه به وجود توالی‌های تکراری فراوان در ژنوم گونه مورد بررسی و اینکه آغازگرهای ISSR نیز شامل بخش‌هایی از این توالی‌های تکراری هستند، احتمال دارد آغازگرها نواحی مربوط به اینترون‌ها را تکثیر کرده باشند. دوم، تعداد پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه به اندازه کافی زیاد نبوده است تا تصویر جامع و کاملی از پروفایل DNA گیاه فراهم کند. بنابراین، استفاده از تعداد بیشتری پرایمر و بررسی جامع‌تر ژنوم ممکن است منجر به دستیابی به مقادیر همبستگی بالاتری بین داده‌های مولکولی و صفات مورفولوژیکی شود.

نقشه بای‌ارتباطی

به منظور شناسایی نشانگرهای ISSR مرتبط با صفات

خوشه نیز با چندین نشانگر ارتباط معنی‌داری نشان داد. از جمله، UBC823 با ضریب $0/856$ و تأثیر منفی، اثر کاهشی بر این صفت داشت. درحالی‌که UBC808 با ضریب تأثیر مثبت بالا به‌عنوان عامل افزایشدهنده طول خوشه شناخته شد. تعداد ساقه در بوته تحت تأثیر مثبت و قابل توجه نشانگرهای IS11 با ضریب $0/409$ و IS6 با ضریب $0/596$ قرار داشت و این نشانگرها ارتباط معناداری با افزایش شاخه‌زایی داشتند. عملکرد وزن خشک علوفه به‌طور عمده با نشانگر UBC825 با ضریب $0/546$ و تأثیر بالا مرتبط بود. همچنین IS11 با تأثیر منفی، به‌عنوان عامل کاهش عملکرد معرفی شد. درصد قابلیت هضم ماده خشک نیز بیشترین ارتباط را با نشانگر UBC880 با ضریب $0/477$ داشت. همچنین UBC808 نیز با ضریب تأثیر مثبت، عامل افزایش این صفت بود. درصد پروتئین خام تحت تأثیر مثبت نشانگر UBC880 با ضریب $0/277$ قرار داشت، درحالی‌که IS11 و UBC886 با ضریب‌های منفی، نقش کاهنده‌ای داشتند. برای صفت درصد فیبر محلول در شوینده اسیدی، نشانگر UBC823 با ضریب تأثیر منفی قوی، اثر کاهشی چشمگیری داشت. از طرفی، IS11 و UBC880 با اثر مثبت در افزایش فیبر محلول نقش داشتند. در مورد درصد خاکستر کل، IS11 با ضریب $0/380$ و تأثیر مثبت بیشترین اثر را داشت و همچنین نشانگرهای UBC808 و UBC835 نیز با اثر افزایشی معنادار شناسایی شدند. در نهایت، درصد کربوهیدرات‌های محلول در آب به‌شدت تحت تأثیر نشانگر UBC842 با ضریب $0/662$ قرار داشت که این نشانگر، نقش افزایشی معناداری در بهبود این صفت ایفا کرد. ملکی و همکاران (۲۰۲۳) با استفاده از ۲۸ پرایمر ISSR، تنوع ژنتیکی در ۳۴ ژنوتیپ *Ag. desertorum* را مورد بررسی قرار دادند و ۴۴۸ مکان را تکثیر کردند که ۹۰٪ آن‌ها چندشکلی بودند. آنالیز ساختار جمعیتی با روش‌های بی‌زی و WPGMA، ژنوتیپ‌ها را به دو گروه عمده به همراه تعدادی ژنوتیپ آمیخته تقسیم کرد. این مطالعه توانست ژنوتیپ‌های زودرس و دیررس را از هم تفکیک کند و نشان داد که نشانگرهای ISSR می‌توانند در انتخاب ژنوتیپ‌های با عملکرد بالا در تولید علوفه مؤثر باشند.

برنامه‌های اصلاحی معرفی می‌شود. پس از آن، نشانگر UBC880 در شش صفت و نشانگرهای UBC825 و UBC808 هر کدام در پنج صفت مختلف حضور معنی‌دار داشتند. این یافته‌ها نشان می‌دهد که برخی نشانگرها با عملکرد چندگانه، می‌توانند به‌عنوان ابزارهای مؤثر در شناسایی ژن‌های کنترل‌کننده صفات پیچیده در برنامه‌های ژن‌یابی و اصلاح نباتات مورد استفاده قرار گیرند. بررسی الگوی توزیع نشانگرهای ISSR در ارتباط با صفات مختلف نشان داد که صفات ارتفاع بوته، طول میانگره و طول خوشه، هر یک با شش نشانگر مختلف ارتباط آماری معنی‌دار داشتند و در صدر صفاتی قرار گرفتند که بیشترین وابستگی را با نشانگرهای مورد استفاده نشان دادند. این امر حاکی از ماهیت پلی‌ژنی این صفات و حساسیت آن‌ها به کنترل ژنتیکی چندگانه است. از این‌رو، این صفات می‌توانند شاخص‌های مناسبی برای برنامه‌های اصلاحی مبتنی بر نشانگر و نقشه‌یابی ارتباطی در این گونه ارزشمند مرتعی باشند.

برای صفت ارتفاع بوته، نشانگر UBC823 با ضریب تعیین تعدیل‌شده $0/929$ و مقدار معناداری $0/005$ به‌عنوان قوی‌ترین عامل مؤثر شناخته شد. همچنین نشانگرهای UBC835 و IS14 به‌ترتیب با ضریب‌های $0/885$ و $0/848$ و مقادیر معنی‌داری $0/022$ و $0/023$ در رتبه‌های بعدی قرار گرفتند و اثر مثبتی بر افزایش ارتفاع بوته داشتند. در صفت طول میانگره، نشانگر UBC886 با ضریب $0/862$ و ضریب تأثیر منفی، نقش مهمی در کاهش این صفت ایفا نمود. همچنین نشانگر UBC808 با ضریب $0/552$ و تأثیر مثبت، در افزایش طول میانگره مؤثر بود. در خصوص تعداد سنبلیچه در سنبله، نشانگر UBC825 با ضریب $0/684$ و UBC808 با ضریب $0/570$ اثرگذاری مثبتی داشتند. این ارتباط نشان می‌دهد که این نشانگرها با افزایش تعداد سنبلیچه‌ها در ارتباط مستقیم هستند. طول برگ پرچم به‌شدت تحت تأثیر نشانگر UBC808 قرار داشت که با ضریب $0/425$ و ضریب تأثیر بالا نقش افزایشی بر این صفت داشت. در مقابل، UBC880 با ضریب تأثیر منفی موجب کاهش این صفت گردید. طول

جدول ۶. نقشه‌یابی ارتباطی نشانگر مولکولی ISSR و صفات مورفولوژیک و کیفیت علوفه *E. hispidus* var. *villosus*Table 6. Linkage mapping of ISSR molecular markers and morphological traits and forage quality of *E. hispidus* var. *villosus*

Traits	Primers	Adjusted R Square	R Square Change	B	Beta	Sig	Traits	Primers	Adjusted R Square	R Square Change	B	Beta	Sig
PLH	IS11	.242	.275	7.012	.404	.009	NSB	IS11	.409	.435	8.427	.562	.000
	UBC825	.564	.135	6.038	.620	.015		IS6	.596	.197	4.599	.367	.003
	UBC880	.750	.173	7.441	.629	.001	DW	UBC825	.525	.546	1284.277	.686	.000
	UBC825	.804	.053	4.038	.420	.023		UBC811	.652	.137	232.978	.158	.007
	IS14	.848	.041	-5.306	-.449	.023	DMD	IS11	.758	.107	-391.933	-.265	.005
	UBC835	.885	.032	-3.792	-.321	.022		IS11	.142	.179	-.798	-.275	.039
	UBC823	.929	.033	-1.068	-.110	.005		UBC808	.291	.174	.843	.390	.027
	UBC825	.200	.234	5.019	.972	.017		UBC880	.477	.192	-2.145	-.549	.009
INL	UBC880	.358	.179	-4.613	-.947	.019	CP	UBC823	.578	.107	.829	.384	.026
	UBC808	.552	.197	5.470	.912	.005		UBC880	.277	.308	.895	.752	.005
	IS11	.671	.117	-5.752	-.880	.010	WSC	IS11	.477	.215	-.528	-.515	.006
	IS14	.757	.082	-3.387	-.565	.012		UBC886	.677	.196	-.550	-.517	.001
NSS	UBC886	.862	.089	-2.865	-.478	.001		IS14	.224	.258	.348	.375	.011
	IS11	.913	.041	3.872	.440	.005		UBC811	.373	.170	.414	.363	.021
	UBC835	.261	.293	1.285	.426	.006	ADF	UBC886	.525	.159	-.244	-.319	.012
	IS14	.390	.149	1.292	.522	.027		UBC842	.662	.134	.408	.534	.007
FLL	UBC808	.570	.183	1.590	.574	.005	ASH	IS11	.258	.290	1.181	.413	.007
	UBC825	.684	.113	.858	.376	.010		UBC823	.497	.251	-1.365	-.641	.003
	UBC808	.425	.179	1.458	.560	.014	SPL	UBC880	.679	.180	1.786	.464	.002
	UBC880	.538	.123	-1.426	-.674	.022		UBC808	.189	.224	.348	.407	.019
SPL	UBC880	.276	.308	-3.164	-.930	.005		IS11	.380	.210	.332	.477	.011
	UBC808	.517	.251	4.433	1.059	.002		UBC835	.516	.145	.336	.393	.016
	IS11	.632	.120	-3.342	-.732	.013							
	UBC825	.751	.114	1.036	.287	.004							
	UBC823	.856	.093	-1.951	-.574	.001							
	UBC840	.892	.033	-.994	-.292	.017							

ارتفاع بوته (PLH)، طول میانگره (INL)، تعداد سنبله در سنبله (NSS)، طول برگ پرچم (FLL)، طول خوشه (SPL)، تعداد ساقه در بوته (NSB)، عملکرد وزن خشک علوفه (DW)، درصد قابلیت هضم ماده خشک (DMD)، درصد پروتئین خام (CP)، درصد فیبر محلول در شوینده اسیدی (ADF)، درصد خاکستر کل (ASH) و درصد کربوهیدرات‌های محلول در آب (WSC).

نتیجه‌گیری و پیشنهادها

مطالعه حاضر با ارزیابی ۲۴ ژنوتیپ *E. hispidus* var. *villosus* و بهره‌گیری از نشانگرهای مولکولی ISSR، تنوع ژنتیکی قابل‌ملاحظه‌ای را در صفات مورفولوژیکی و کیفیت علوفه این گونه آشکار ساخت. تجزیه واریانس نشان داد که صفات مورفولوژیک، از جمله ارتفاع بوته، تعداد ساقه در بوته، طول برگ پرچم، و عملکرد وزن خشک علوفه، دارای تفاوت‌های آماری معنی‌دار در سطوح ۱٪ و ۵٪ بودند، در حالی که صفات کیفی نظیر درصد پروتئین خام و قابلیت هضم ماده خشک تنوع کمتری از خود نشان دادند. تجزیه همبستگی فنوتیپی، ارتباط مثبت و معنی‌دار بین عملکرد وزن خشک علوفه و صفات مورفولوژیک کلیدی مانند ارتفاع بوته (سطح ۵٪) و تعداد ساقه در بوته (سطح ۱٪) را تأیید کرد که بر اهمیت این صفات در انتخاب ژنوتیپ‌های برتر برای برنامه‌های اصلاحی تأکید دارد. تجزیه خوشه‌ای با روش UPGMA، ژنوتیپ‌های ۲۳ و ۱۰ را به دلیل برتری در عملکرد وزن خشک علوفه و صفات مورفولوژیک، به‌عنوان کاندیداهای برتر برای برنامه‌های اصلاحی معرفی کرد. این ژنوتیپ‌ها

پتانسیل بالایی برای استفاده در احیای مراتع و تولید علوفه پایدار در شرایط محیطی چالش‌برانگیز نشان دادند. یافته‌های این پژوهش نشان‌دهنده اهمیت ترکیب ابزارهای مولکولی و فنوتیپی در شناسایی ژنوتیپ‌های ممتاز و توسعه راهبردهای اصلاحی هدفمند برای تقویت نظام‌های کشاورزی پایدار است.

تحلیل مولکولی با استفاده از ۱۳ آغازگر ISSR، چندشکلی ۹۷/۹۴٪ را نشان داد و شاخص‌های محتوای اطلاعات چندشکل (PIC)، نسبت چندگانه مؤثر (EMR)، شاخص نشانگری (MI) و قدرت تفکیک (RP) حاکی از تنوع ژنتیکی بالای جمعیت مورد مطالعه بود. نتایج ماتریس تشابه مبتنی بر ضریب دایس، حاکی از تنوع ژنتیکی قابل‌توجه و ساختار ژنتیکی پیچیده است. تجزیه خوشه‌ای ژنوتیپ‌ها را در سه گروه متمایز دسته‌بندی کرد. نشانگر IS11 با ارتباط معنی‌دار با هفت صفت مورفولوژیک و کیفیت علوفه، و نشانگرهای UBC880، UBC825 و UBC808 با ارتباط با چندین صفت، به‌عنوان ابزارهای مؤثر برای نقشه‌یابی ژنومی شناسایی شدند. صفات ارتفاع بوته، طول میانگره، و طول خوشه هر

توجه به تأثیر عوامل محیطی بر صفات کیفی و تنوع محدودتر آن‌ها، پیشنهاد می‌شود آزمایش‌های چندمکانی در شرایط محیطی متنوع انجام شود تا تعاملات ژنوتیپ و محیط بررسی گردد. حفظ ژنوتیپ‌های برتر، به‌ویژه ژنوتیپ‌های ۲۳ و ۱۰ در بانک‌های ژن و بهره‌برداری از آن‌ها در برنامه‌های احیای مراتع نیز توصیه می‌شود تا پایداری تولید علوفه در برابر چالش‌های اقلیمی تضمین شود. این راهکارها می‌توانند به بهبود بهره‌وری مراتع، تقویت نظام‌های کشاورزی پایدار، و حمایت از امنیت غذایی در مناطق خشک و نیمه‌خشک کمک کنند.

تعارض منافع

هیچ‌گونه تعارض منافع توسط نویسندگان وجود ندارد.

یک با شش نشانگر ارتباط معنی‌دار داشتند، که نشان‌دهنده ماهیت پلی‌ژنی این صفات است. برای بهره‌برداری مؤثر از تنوع ژنتیکی مشاهده‌شده، پیشنهاد می‌شود از نشانگرهای ISSR در برنامه‌های انتخاب به کمک نشانگر (MAS) استفاده شود تا ژنوتیپ‌های برتر با صفات مورفولوژیکی و کیفیت علوفه مطلوب به‌سرعت شناسایی و گزینش شوند. همچنین، انجام مطالعات تکمیلی با تعداد بیشتری ژنوتیپ و آغازگرهای SSR و SNP، همراه با فناوری‌های توالی‌یابی نسل جدید (NGS)، می‌تواند دقت نقشه‌یابی ژنومی را افزایش داده و ژن‌های کنترل‌کننده صفات پیچیده را با وضوح بیشتری شناسایی کند. این رویکرد می‌تواند به توسعه استراتژی‌های اصلاحی پیشرفته و تسریع فرآیند بهبود عملکرد و کیفیت علوفه کمک کند. با

منابع

- Ainebekova, B. A., Yerzhanova, S. T., Dossybayev, K., Seitbattalova, A. I., Tilek, K., Kambarbekov, E. A., ... & Meiirman, G. T. (2023). Genetic analysis and molecular characterization of the wheatgrass (*Agropyron cristatum* L. Gaertn.) in South-East Kazakhstan. *SABRAO Journal of Breeding and Genetics*, 55(4), 1132–1141.
- Altintas, S., Toklu, F., Kafkas, S., Kilian, B., Brandolini, A., & Ozkan, H. O. (2008). Estimating genetic diversity in durum and bread wheat cultivars from Turkey using AFLP and SAMPL markers. *Plant Breeding*, 127, 9–14.
- 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(1), 181–186.
- Assadi, M. (1995). Meiotic configuration and chromosome number in some Iranian species of *Elymus* L. and *Agropyron* Gaertner (*Poaceae: Triticeae*). *Botanical Journal of the Linnean Society*, 117(2), 159–168. <https://doi.org/10.1006/bojl.1995.0013>
- Caradus, J. R., & Chapman, D. F. (2024). Evaluating pasture forage plant breeding achievements: a review. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 1–75.
- Carrier, L., Van Waes, C., Rotar, I., Vlahova, M., & Vidican, R. (2009). Forage quality evaluation. *Bulletin of the University of Agricultural Sciences & Veterinary Medicine Cluj-Napoca. Agriculture*, 66(1), [no page numbers provided].
- Cheng, P., Holdsworth, W., Ma, Y., Coyne, C. J., Mazourek, M., Grusak, M. A., ... & McGee, R. J. (2015). Association mapping of agronomic and quality traits in USDA pea single-plant collection. *Molecular Breeding*, 35, 1–13.
- Farshadfar, M., & Farshadfar, A. (2003). Evaluation of genetic diversity in various *Agropyron* accessions based on morphological and biochemical traits. *Journal of Agricultural Science and Natural Resources, Isfahan University of Technology*, 8(2). (in Persian)
- Farshadfar, M., Nowrozi, R., Safari, H., Shirvani, H., & Amjadian, M. (2018). Assessment of genetic diversity in *Agropyron desertorum* accessions using ISSR molecular marker. *Future of Food: Journal of Food and Agricultural Society*, 6(1), 20–27.
- Gemmell, C. E., & Grierson, E. R. (2021). Inter-simple sequence repeats (ISSR), microsatellite-primed genomic profiling using universal primers. In: *Molecular Plant Taxonomy: Methods and Protocols*, 249–262.
- Hatami Maleki, H., Mohammadi, R., Firouzkuhi, F., Darvishzadeh, R., & Zeinalzadeh-Tabrizi, H. (2023). Molecular evidence depicts genetic divergence among *Agropyron elongatum* and *A. cristatum* accessions from gene pool of Iran. *PLOS ONE*, 18(11), e0294694.
- Hou, Y., Yan, Z., & Wei, Y. (2005). Genetic diversity in barley from west China based on RAPD and ISSR analysis. *Barley Genetics Newsletter*, 35, 9–22.

- Ibrahim, A. K., Zhang, L., Niyitanga, S., Afzal, M. Z., Xu, Y., Zhang, L., ... & Qi, J. (2020). Principles and approaches of association mapping in plant breeding. *Tropical Plant Biology*, 13, 212–224.
- Jafari, A., Connolly, V., & Walsh, E. J. (2003). Genetic analysis of yield and quality in forage crops. *Irish Journal of Agricultural and Food Research*, 42(2), 209–221.
- Jones, A., & Brown, T. (2020). *Agropyron* species in rangeland improvement. *Grassland Science*, 12(4), 89–97.
- Khan, M. A., & Korban, S. S. (2012). Association mapping in forest trees and fruit crops. *Journal of Experimental Botany*, 63(11), 4045–4060.
- Kumar, M., Mishra, G. P., Singh, R., Kumar, J., Naik, P. K., & Singh, S. B. (2009). Correspondence of ISSR and RAPD markers for comparative analysis of genetic diversity among different apricot genotypes from cold arid deserts of Trans-Himalayas. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 15(3), 225–236.
- Li, Y., & Chen, Z. (2023). Advances in association mapping for crop improvement. *Molecular Plant Breeding*, 14(1), 56–67.
- Liu, W., Gowda, M., Steinhoff, J., Maurer, H. P., Würschum, T., Longin, C. F. H., ... & Reif, J. C. (2011). Association mapping in an elite maize breeding population. *Theoretical and Applied Genetics*, 123, 847–858.
- Maleki, H. H., Mohammadi, R., Arshad, M., Hasanzadeh, M., & Rafiee, M. (2023). Genetic variability and population structure of *Agropyron desertorum* accessions from Iran based on inter simple sequence repeat (ISSR) assay. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 70(8), 2511–2520.
- Mohammadi, R., Khayam Nekouei, M., Mirlouhi, A., & Razmjoo, K. (2006). Evaluation of genetic diversity among different populations of the forage and rangeland species *Agropyron elongatum*. *Iranian Journal of Genetics and Breeding of Rangeland and Forest Plants*, 14(1). (in Persian)
- Moradi, M., Farshadfar, E., & Safari, H. (2015). Evaluation of genetic diversity in *Agropyron cristatum* using ISSR molecular marker. *Journal of Biodiversity and Environmental Sciences*, 6(5), 425–432. (in Persian)
- Powell, W., Morgante, M., Andre, C., Hanafey, M., Vogel, J., Tingey, S., & Rafalski, A. (1996). The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. *Molecular Breeding*, 2, 225–238.
- Prince, L. M. (2015). Plant genotyping using fluorescently tagged inter-simple sequence repeats (ISSRs): basic principles and methodology. In: *Plant Genotyping: Methods and Protocols*, 63–75.
- Rahmani, A., Jafari, A. A., & Ghaleh Nader, E. (2009). Evaluation of seed yield and forage production in cultivars and accessions of *Agropyron cristatum* under rainfed and irrigated conditions in the cold temperate region of northern Lorestan. *Iranian Journal of Range and Desert Research*, 16(1), 66–78. (in Persian)
- Rahmani, A., Jafari, A. A., & Torkaman, M. (2006). Evaluation of forage yield and quality of 18 *Agropyron cristatum* ecotypes for rangeland improvement and pasture development. *Iranian Journal of Range and Desert Research*, 13(1), 53–61. (in Persian)
- Safari, H., Afzali, P., Etminan, A., Shirvani, H., & Fereidooni, L. (2022). The study of genetic diversity in *Agropyron intermedium* genotypes using ISSR and leaf soluble proteins markers. *Cereal Biotechnology and Biochemistry*, 1(3), 358–374. (in Persian)
- Safari, H., Miri, E., Etminan, A., Shirvani, H., & Fereidooni, L. (2022). Evaluating the effectiveness of ISSR and leaf soluble proteins markers in investigating the conformity of the genetic diversity of *Agropyron elongatum* genotypes with their geographical distribution. *Cereal Biotechnology and Biochemistry*, 1(4), 463–480. (in Persian)
- Safari, H., Shirvani, H., & Etminan, A. (2017). Assessment of genetic variation in *Agropyron intermedium* accessions using cytogenetic and morphological traits. *MGJ*, 11(4), 623–627. (in Persian)
- Sahu, H. E. M. A. N. T., Amadabade, J. A. I. R. A. M., & Dhiri, N. A. M. R. A. T. A. (2015). Association mapping: a useful tool. *International Journal of Plant Sciences*, 10, 85–94.
- Sayedmohammadi, S. A., Jafari, A. A., Seyedmohammadi, N. S., & Sadat, S. (2012). Determining diversity and genetic distance of 31 genotypes of *Agropyron desertorum* for grain yield and its components using multivariate statistical methods. *Romanian Agricultural Research*, 29, 95–102. (in Persian)
- Torres, A. M., Weeden, N. F., & Martin, A. (1993). Linkage among isozyme, RFLP and RAPD markers in *Vicia faba*. *Theoretical and Applied Genetics*, 85, 935–945.
- Wang, J. B., Deng, J. Y., & Fang, F. X. (2002). ISSR molecular marker technique and its application in horticultural crops. *Hereditas*, 24, 613–616.
- Wu, S., Lü, X., Liu, Q., Wuda, E., Li, L., Zhao, C., ... & Yin, C. (2025). The geographical variation in grassland forage quality on the eastern Qinghai-Tibet Plateau is driven mainly by climate. *Ecological Processes*, 14(1), 1–14.

Comprehensive Identification of Candidate Genes and Regulatory Transcription Factors Governing Sesquiterpene Lactone Biosynthesis in Sunflower via Weighted Gene Co-expression Network Analysis (WGCNA)

Saadat Mohammadnejad¹, Mohammad Majdi^{2*}, Ghader Mirzaghaderi³, Asad Maroufi⁴

1. Ph.D. Student in Agricultural Biotechnology, Department of Plant Production and Genetics, Faculty of Agriculture, Kurdistan University, Sanandaj, Iran.

2. Associate Professor, Department of Plant Production and Genetics, Faculty of Agriculture, Kurdistan University, Sanandaj, Iran.

3. Professor, Department of Plant Production and Genetics, Faculty of Agriculture, Kurdistan University, Sanandaj, Iran.

4. Associate Professor, Department of Plant Production and Genetics, Faculty of Agriculture, Kurdistan University, Sanandaj, Iran.

Correspondence:

Mohammad Majdi

Email: majdi60@gmail.com

Received: 8, Sep. 2025

Accepted: 17, Nov. 2025

How to cite:

Mohammadnejad, S., Majdi, M., Mirzaghaderi, Gh., & Maroufi, A. (2025). Comprehensive Identification of Candidate Genes and Regulatory Transcription Factors Governing Sesquiterpene Lactone Biosynthesis in Sunflower via Weighted Gene Co-expression Network Analysis (WGCNA). *Crop Biotechnology*, 15 (1), 46-61.

(DOI: [10.30473/cb.2025.75726.2016](https://doi.org/10.30473/cb.2025.75726.2016))

ABSTRACT

Sesquiterpene lactones (STLs) are a group of bioactive secondary metabolites synthesized in the sunflower mevalonate pathway through the action of key upstream enzymes, including *HaGAS1/2*, *HaGAO1/2*, *HaCOS*, and *HaG8H*. These compounds, such as dehydrocostuslactone, 8-epixanthatin, and tomentosin, play important biological roles, yet the precise genes involved in their biosynthesis remain incompletely characterized. In this study, transcriptomic data under treatments with ethylene, salicylic acid, methyl jasmonate, and polyethylene glycol were analyzed, and several candidate genes were identified using gene co-expression network analysis, including putative costunolide synthases (LOC110928784, LOC110928786) and genes involved in DBR2-like reduction reactions (LOC110893694, LOC110886996). Promoter analysis of key pathway genes revealed gene-specific distributions of cis-regulatory motifs, including W-box, G-box, GCC-box, bZIP, and CBF2/RAA. Several candidate genes encoding bZIP (XP_022029119 and XP_022023437) and ERF (XP_021969365, XP_022017763, and XP_022002255) transcription factors were also identified as potential regulators of key pathway genes. Gene expression analysis by qPCR in six selected genes showed that upstream genes (*HaGAS1*, *HaGAO1*, *HaG8H*, *HaCOS*) were predominantly expressed in leaves and glandular trichomes. In contrast, downstream genes (LOC110928784, LOC110893694) exhibited preferential expression in roots, indicating spatial partitioning of STL biosynthesis in sunflower. Overall, these findings reveal new components of the STL biosynthetic pathway and its regulatory factors, providing valuable targets for metabolic engineering and novel biocontrol strategies in sunflower.

KEYWORDS

Sesquiterpene Lactone, Sunflower, Transcriptome, Weighted Gene Co-Expression Network Analysis



«مقاله پژوهشی»

شناسایی ژن‌ها و فاکتورهای رونویسی دخیل در بیوستتسز سزکویی‌ترین لاکتون‌ها در آفتابگردان با استفاده از تحلیل شبکه هم‌بیانی وزندارژن‌ها

سعادت محمدنژاد^۱، محمد مجدی^۲ , قادر میرزاقادری^۳، اسعد معروفی^۴

چکیده

سزکویی‌ترین لاکتون‌ها گروهی از متابولیت‌های ثانویه زیست‌فعال هستند که در مسیر موالونات آفتابگردان با دخالت آنزیم‌های بالادستی کلیدی شامل *HaGAS1/2*، *HaGAO1/2*، *HaCOS* و *HaG8H* سنتز می‌شوند. این ترکیبات، مانند دهیدروکاستوس لاکتون، ۸-اپیزانتاتین و تومتوسین، نقش‌های زیستی مهمی دارند، اما ژن‌های دقیق دخیل در بیوستتسز آن‌ها به‌طور کامل شناسایی نشده‌اند. در این مطالعه، داده‌های ترنسکریپتومی تحت تیمارهای اتیلن، سالیسیلیک‌اسید، متیل‌جاسمونات و پلی‌اتیلن‌گلیکول تحلیل شد و با استفاده از شبکه هم‌بیانی ژن‌ها چندین ژن کاندید شناسایی گردید، از جمله سنتتازهای احتمالی کاستونولید (LOC110928784، LOC110928786) و ژن‌های دخیل در واکنش‌های کاهش مشابه DBR2 (LOC110893694). تحلیل پروموتور ژن‌های کلیدی مسیر نشان داد موتیف‌های سیس‌تنظیمی اختصاصی شامل CBF2/RAA و bZIP، GCC-box، G-box، W-box در ژن‌ها توزیع ژن اختصاصی دارند. همچنین چندین ژن کاندید مربوط به فاکتورهای رونویسی bZIP و ERF به‌عنوان تنظیم‌کننده‌های احتمالی ژن‌های کلیدی مسیر شناسایی شدند. بیان ژن‌ها با روش qPCR در شش ژن منتخب بررسی شد و نتایج نشان داد ژن‌های بالادستی (*HaCOS*، *HaG8H*، *HaGAO1*، *HaGAS1*) عمدتاً در برگ‌ها و ترکیب‌های غده‌ای و ژن‌های پایین‌دستی (LOC110928784، LOC110893694) در ریشه‌ها بیان ترجیحی دارند، که نمایانگر تقسیم فضایی بیوستتسز سزکویی‌ترین لاکتون‌ها است. به‌طور کلی، یافته‌ها اجرای جدیدی از مسیر بیوستتسز سزکویی‌ترین لاکتون‌ها و فاکتورهای تنظیمی آن را آشکار می‌کنند و اهداف ارزشمندی برای مهندسی متابولیک و توسعه رویکردهای نوین کنترل بیولوژیک گل‌جالیز فراهم می‌سازند.

واژه‌های کلیدی

آفتابگردان، ترانسکریپتوم، سزکویی‌ترین لاکتون، شبکه هم‌بیانی وزندارژن‌ها.

۱. دانشجوی دکتری بیوتکنولوژی کشاورزی، گروه تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه کردستان، سنندج، ایران.
۲. دانشیار، گروه تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه کردستان، سنندج، ایران.
۳. استاد، گروه تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه کردستان، سنندج، ایران.
۴. دانشیار، گروه تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه کردستان، سنندج، ایران.

نویسنده مسئول:

محمد مجدی

رایانامه: majidi60@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۰۶/۱۷

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۸/۲۶

استناد به این مقاله:

محمدنژاد، سعادت؛ مجدی، محمد؛ میرزاقادری، قادر و معروفی، اسعد (۱۴۰۴). شناسایی ژن‌ها و فاکتورهای رونویسی دخیل در بیوستتسز سزکویی‌ترین لاکتون‌ها در آفتابگردان با استفاده از تحلیل شبکه هم‌بیانی وزندارژن‌ها، فصلنامه علمی زیست‌فناوری گیاهان زراعی، ۱۵ (۱)، ۴۶-۶۱.

(DOI: [10.30473/cb.2025.75726.2016](https://doi.org/10.30473/cb.2025.75726.2016))

مقدمه

سزکویی‌ترین لاکتون‌ها گروهی متنوع از متابولیت‌های ثانویه ایزوپرنوئیدی هستند که عمدتاً در تیره کاسنیان تجمع می‌یابند. این ترکیبات با ساختارهای گوناگون خود نقش مهمی در دفاع گیاه، برهم‌کنش‌های زیستی و تحریک جوانه‌زنی انگل‌های ریشه‌ای ایفا می‌کنند. تاکنون بیش از ۵۰۰۰ ساختار شناسایی شده که بسیاری از آن‌ها دارای خواص دارویی ارزشمند و کاربردهای مهم در کشاورزی هستند (Majdi et al., 2016).

در آفتابگردان، مجموعه‌ای از سزکویی‌ترین لاکتون‌ها شامل کاستونولید، ۸-β-هیدروکسی کاستونولید، ۸-پی-زانتاتین، تومننوزین و دهیدروکاستوس لاکتون در اندام‌های مختلف گیاه سنتز و ترشح می‌شوند. این ترکیبات هم در دفاع شیمیایی و هم در القای جوانه‌زنی گونه‌های *O. minor* و *Orobanche cumana* نقش دارند (Spring, 2021; Spring et al., 2020). مسیر بیوسنتزی آن‌ها تا حدی شناخته شده است و شامل آنزیم‌های کلیدی مانند *HaGAO1/2*، *HaGAS1/2*، *HaG8H (CYP71BL1)* و *HaCOS (CYP71BL9)* می‌شود. این آنزیم‌ها در تولید کاستونولید و ۸-β-هیدروکسی جرم‌اکرین A اسید نقش دارند که به ترتیب پیش‌ساز ترکیبات دهیدروکاستوس لاکتون‌ها، ۸-پی-زانتاتین و آرگوفیلین B محسوب می‌شوند (Frey et al., 2018). علاوه بر این، آنزیم اوپاتولیدسنتاز (*HaES*) تبدیل مستقیم ۸-β-هیدروکسی جرم‌اکرین A اسید به اوپاتولید را کاتالیز می‌کند و بدین ترتیب نقش مهمی در تکمیل این مسیر دارد (Frey et al., 2019).

بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه به‌طور عمده توسط عوامل رونویسی تنظیم می‌شود. این پروتئین‌ها با اتصال به عناصر سیس در پروموتور ژن‌ها، بیان آن‌ها را فعال یا سرکوب کرده و در نتیجه جریان‌های متابولیکی را کنترل می‌کنند. همچنین عوامل رونویسی با یکپارچه‌سازی سیگنال‌های محیطی و توسعه‌ای، می‌توانند به‌طور همزمان چندین ژن را در یک مسیر بیوشیمیایی تنظیم کنند. تاکنون نقش این تنظیم‌کننده‌ها در مسیرهای مختلف متابولیت‌های ثانویه، از جمله فلاونوئیدها،

آلکالوئیدها و فیتوالکسین‌های سزکویی‌ترینی گزارش شده است (Chen et al., 2017; Li et al., 2015).

با وجود شناسایی چند ژن کلیدی در مسیر بیوسنتزی سزکویی‌ترین لاکتون‌ها در آفتابگردان، این مسیر تنها تا مراحل میانی (کاستونولید و ۸-β-هیدروکسی جرم‌اکرین A اسید) مشخص شده و ژن‌های دخیل در واکنش‌های پایین‌دستی و تشکیل مشتقات نهایی، به‌ویژه دهیدروکاستوس لاکتون‌ها، همچنان ناشناخته‌اند. همچنین اطلاعات اندکی در مورد سازوکارهای تنظیمی و ترشحی این ترکیبات وجود دارد. پر کردن این خلأ دانشی برای توسعه ابزارهای زیست‌فناورانه در بهبود مقاومت گیاه و مدیریت آفات اهمیت زیادی دارد. در این پژوهش، با استفاده از تحلیل ترنسکرپتومیک و شبکه هم‌بیانی وزنی ژن‌ها تحت شرایط تنشی (اتیلن، سالیسیلیک اسید، متیل جاسمونات و پلی‌اتیلن گلیکول)، ژن‌های احتمالی مراحل پایین‌دستی بیوسنتز و عوامل رونویسی مرتبط با آن‌ها شناسایی و از جنبه‌های فیلوژنتیکی، ساختاری و بیانی بررسی شدند. این مطالعه به‌عنوان نخستین رویکرد جامع در آفتابگردان، بینش‌های تازه‌ای درباره کنترل مولکولی تولید سزکویی‌ترین لاکتون‌ها ارائه می‌دهد و می‌تواند پایه‌ای برای راهبردهای نوین در بهبود مقاومت گیاه، مدیریت پایدار آفات و بهره‌برداری دارویی از این ترکیبات فراهم کند.

روش‌شناسی پژوهش

تحلیل ترنسکرپتوم

برای تحلیل و شناسایی ژن‌های کاندید و فاکتورهای رونویسی مرتبط با مسیرهای بیوسنتزی سزکویی‌ترین لاکتون‌ها، داده‌های RNA-seq عمومی از ریشه‌های آفتابگردان تحت تیمار با هورمون‌ها و تنش اسمزی (اتیلن، سالیسیلیک اسید، متیل جاسمونات و پلی‌اتیلن گلیکول) از پایگاه NCBI (SRA, PRJNA328564) بازیابی شدند. پس از کنترل کیفیت و حذف خوانش‌های نامناسب با Fastq 123، داده‌ها برای هم‌ترازی و تحلیل آماده گردیدند (Eidi et al., 2024). خوانش‌های پاک با (Kim et

مواد گیاهی، استخراج RNA و آنالیز کمی RT-PCR
برای بررسی بیان ژن‌های کاندید در مسیر بیوسنتز سزکویی‌ترین لاکتون‌ها، بذرهاي *H. annuus* L. استخراج شده گلخانه‌ای *XRQR2.0-SUNRISE* در شرایط کنترل شده گلخانه‌ای در دانشگاه آمستردام، هلند کشت شدند و از بافت‌های ریشه و برگ گیاهچه‌های دو هفته‌ای، RNA کل با استفاده از معرف TRIzol بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده استخراج و سنتز cDNA رشته اول با SuperScript™ III Reverse Transcriptase انجام گرفت.

شش ژن کاندید (*G8H*, *COS*, *GAO1*, *GAS1*) برای آنالیز qRT-PCR انتخاب و پرایمرهای اختصاصی آن‌ها با Primer-BLAST طراحی شدند (جدول ۱). سنجش بیان با qRT-PCR و کیت SsoAdvanced™ Universal SYBR Green Supermix در دستگاه StepOnePlus™ Real-Time PCR انجام شد. واکنش‌ها شامل ۳ تکرار بیولوژیکی و ۳ تکرار تکنیکی بودند و *Actin2* به عنوان ژن مرجع برای نرمال‌سازی استفاده گردید. محاسبه بیان نسبی ژن‌ها بر اساس روش $2^{-\Delta\Delta Ct}$ صورت گرفت.

تحلیل عناصر تنظیمی سیس در پروموتورهای

ژن‌های کلیدی بیوسنتز سزکویی‌ترین لاکتون‌ها توالی‌های پروموتور (۲ کیلوباز بالادست کدون آغازین *ATG*) ژن‌های کلیدی *HaGAO1/2*, *HaGAS1/2*, *HaCOS*, *HaG8H* و *HaES* از پایگاه داده NCBI بازیابی شدند. شناسایی و حاشیه‌نویسی عناصر تنظیمی سیس با استفاده از پایگاه داده PlantCARE انجام شد (Maqsood et al., 2022). تا موتیف‌های تنظیمی رونویسی پیش‌بینی کردند. توزیع مکانی و نمایش گرافیکی عناصر تنظیمی سیس با بهره‌گیری از نرم‌افزار TBtools تولید شد تا تصویر دقیقی از چارچوب تنظیمی بالقوه کنترل‌کننده بیوسنتزی در آفتابگردان ارائه دهد.

HISAT2 v2.2.1 (al., 2019) به ژنوم مرجع آفتابگردان (*HanXRQR2.0-SUNRISE*) (Fernández-Aparicio et al., 2022) هم‌تراز شدند و خروجی‌های SAM با SAMtools به فرمت BAM تبدیل شدند (Li et al., 2009). در ادامه، کمیت‌بندی در سطح ژن با استفاده از featureCounts از بسته Subread انجام شد و داده‌های شمارشی خام برای تحلیل بیان تفاضلی و تفسیر عملکردی ژن‌ها مورد استفاده قرار گرفتند (Liao et al., 2014).

ساخت شبکه هم‌بیانی وزندار ژن‌ها، ساختار ژن و موتیف‌های محافظت‌شده

برای شناسایی ژن‌های کاندید پایین دست و عوامل رونویسی ژن‌های کلیدی مسیر بیوسنتزی، تحلیل شبکه هم‌بیانی وزندار ژن‌ها با بسته WGCNA در R v4.4.0 انجام شد (Fasoli et al., 2018). تحلیل شامل تمام ژن‌های بیان‌شده تحت تیمار با اتیلن، سالیسیلیک اسید، متیل جاسمونات و پلی‌اتیلن گلیکول بود. ماتریس مجاورت بر اساس همبستگی زوجی ژن‌ها محاسبه شد و با انتخاب آستانه نرم مناسب، معیار توپولوژی بدون مقیاس برقرار شد ($R^2=0.9$). ماتریس مجاورت سپس به ماتریس همپوشانی توپولوژیک تبدیل و خوشه‌بندی سلسله‌مراتبی برای شناسایی ماژول‌ها انجام شد ($\text{minModuleSize}=30$). ماژول‌های مشابه بر اساس تشابه ($\text{merge CutHeight}=0.25$) ادغام شدند. ماژول‌های ژنی شامل ژن‌های کلیدی *HaGAS1/2*, *HaGAO1/2*, *HaCOS*, *HaG8H* و *HaES* شناسایی شدند و ژن‌های هم‌بیان مرتبط با آن‌ها استخراج شدند. شبکه‌های هم‌بیان‌ژنی با (v3.10.3) Cytoscape تجسم شدند.

ساختار اگزون-اینترون ژن‌های کاندید دخیل در مسیر بیوسنتز سزکویی‌ترین لاکتون‌ها با استفاده از نرم‌افزار TBtools تجسم شد. موتیف‌های محافظت‌شده با بهره‌گیری از ابزار MEME Suite شناسایی شدند (Chen et al., 2020). در مجموع، ۱۵ موتیف محافظت‌شده با استفاده از پارامترهای پیش‌فرض آنالیز شدند.

سزکویی ترین لاکتون های مرتبط در آفتابگردان، تحلیل هم بیانی وزندارژن ها بر داده های RNA-seq حاصل از ریشه گیاهان تحت تیمارهای اتیلن، سالیسیلیک اسید، متیل جاسمونات و پلی اتیلن گلیکول انجام شد. این تحلیل چندین ماژول هم بیان متمایز در پاسخ به هر تیمار شناسایی کرد. بیشترین تعداد ماژول در تیمار اتیلن (۴۲ ماژول) و سالیسیلیک اسید (۳۵ ماژول) و کمترین در متیل جاسمونات و پلی اتیلن گلیکول هر کدام (۲۴ ماژول) مشاهده شد. این تفاوت بیانگر تنوع بالای الگوهای تنظیمی در شرایط مختلف هورمونی و تنشی است.

شبکه هم بیانی ژن های کلیدی مسیر بیوسنتز

سزکویی ترین لاکتون ها در آفتابگردان
ژن های کلیدی مسیر بیوسنتز سزکویی ترین لاکتون ها در آفتابگردان شامل *HaCOS*، *HaGAO1/2*، *HaGAS1/2*، *HaES* و *HaG8H* هستند (Frey et al., 2020; Spring et al., 2020). تحلیل داده های RNA-seq ریشه تحت تیمارهای اتیلن، سالیسیلیک اسید، متیل جاسمونات و پلی اتیلن گلیکول نشان داد این ژن ها در ماژول های هم بیانی مشخصی خوشه بندی شده اند. هر ماژول شامل مجموعه ای از ژن هاست (۱۰۰ تا ۳۰۰ ژن هم بیان) که به طور هماهنگ با ژن های کلیدی مسیر بیان می شوند. شبکه هم بیانی بین ژن های کاندید مسیر پایین دستی و فاکتورهای رونویسی شناسایی شده تحت تیمارهای مختلف، همراه با ژن های کلیدی مسیر، در شکل (۱) با استفاده از نرم افزار Cytoscape نمایش داده شده است.

تحلیل مقایسه ای همولوژی، ساختار ژنی و موتیف های محافظت شده در ژن های کاندیدای مرتبط با بیوسنتز سزکویی ترین لاکتون ها در آفتابگردان

شناسایی ژن های مرتبط با بیوسنتز کاستونولید در آفتابگردان

تحلیل شبکه هم بیانی داده های ترنسکرپتومی ریشه آفتابگردان تحت چهار تیمار اتیلن، سالیسیلیک اسید،

رده بندی فیلوژنتیک خانواده های ژنی bZIP و ERF در آفتابگردان

براساس نتایج WGCNA، ۵ ژن bZIP و ۱۲ ژن ERF شناسایی شدند. برای بررسی روابط تکاملی و رده بندی فیلوژنتیک، توالی های پروتئینی ژن های bZIP و ERF از پایگاه داده TAIR بازیابی شدند (Wu et al., 2021). تراز چندتایی توالی های آمینواسیدی با استفاده از الگوریتم ClustalW در نرم افزار (v12) MEGA انجام شد (Li et al., 2012). بازسازی درخت فیلوژنتیک با روش Neighbor-Joining، مدل جایگزینی پویسون و حذف جفتی شکاف ها صورت گرفت، پشتیبانی آماری هر گره از طریق تحلیل bootstrap با ۱۰۰۰ تکرار ارزیابی شد. درخت فیلوژنتیک بدون ریشه حاصل، به عنوان چارچوبی برای رده بندی اعضای خانواده های bZIP و ERF در مقایسه با همولوگ های آن ها در آرکیدوپسیس مورد استفاده قرار گرفت.

تحلیل بیان ژن های کاندید فاکتورهای رونویسی در

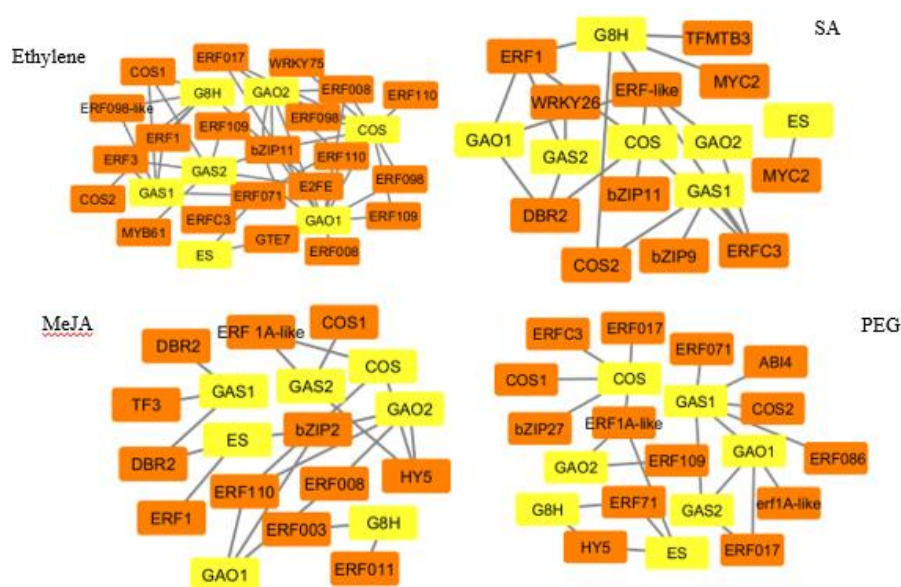
ریشه آفتابگردان تحت شرایط آزمایشی مختلف
بر اساس داده های RNA-Seq استخراج شده پیشین، الگوهای بیان ژن های کاندید فاکتورهای رونویسی تحلیل شدند. میزان بیان ژن ها به صورت تعداد قطعات در هر کیلوباز ژن نسبت به میلیون (FPKM) کمی سازی شد. برای نرمال سازی داده ها، مقادیر FPKM با استفاده از فرمول $\log_2(n+1)$ لگاریتمی شدند، که در آن n نشان دهنده مقدار FPKM هر ژن است. سپس، با استفاده از نرم افزار TBtools، نقشه حرارتی ایجاد شد تا پروفایل بیان ژن های کاندید فاکتورهای رونویسی در بافت ریشه آفتابگردان تحت شرایط آزمایشی مختلف به طور دقیق نمایش داده شود.

یافته های پژوهش و نتیجه گیری

شناسایی ماژول های هم بیان مرتبط با ژن های کاندید به منظور شناسایی ژن های کاندید دخیل در مراحل پایین دستی و عوامل رونویسی ژن های کلیدی مسیر بیوسنتز

کاستونولید سنتاز در گونه‌های مختلف خانواده کاسنیان دارند. همان‌طور که در جدول (۲) آمده است، درصد هویت اسیدهای آمینه برای *HaCOS* بین ۵۶/۲۵ تا ۶۲/۳۷ درصد، برای *LOC110928784* بین ۵۷/۷۸ تا ۶۴/۸۰ درصد و برای *LOC110928786* بین ۵۸/۳۸ تا ۶۴/۷۷ درصد متغیر بود. نکته مهم آنکه شباهت دو ژن جدید به ارتولوگ‌های *COS* از *HaCOS* بیشتر بود که این موضوع احتمال نقش فعال آن‌ها در بیوستنز کاستونولید را تقویت می‌کند.

متیل‌جاسمونات و پلی‌اتیلن‌گلیکول، به شناسایی دو ژن جدید از خانواده *CYP450* منجر شد *LOC110928784* و *LOC110928786*. این دو ژن هم‌پایان با *HaCOS (CYP71BL9)* بودند؛ آزمیمی که پیش‌تر توسط Frey و همکاران (2020) به‌عنوان یکی از عناصر کلیدی مسیر بیوستنز کاستونولید معرفی شده بود. بررسی شباهت توالی نشان داد که پروتئین‌های پیش‌بینی‌شده حاصل از *LOC110928784* و *LOC110928786* شباهت بالایی با ارتولوگ‌های



شکل ۱. شبکه‌های هم‌پایانی ژنی تحت تیمارهای اتیلن، SA، سالیسیلیک اسید، MeJA، متیل‌جاسمونات، و PEG: پلی‌اتیلن‌گلیکول. ژن‌های هدف 1/2 *HaGAS*، *HaGAO1/2*، *HaCOS*، *HaG8H* و *HaES* به همراه ژن‌های هم‌پایان آن‌ها نشان داده شده‌اند. جعبه‌های زرد ژن‌های هدف و جعبه‌های نارنجی ژن‌های هم‌پایان را مشخص می‌کنند.

Figure 1. Co-expression networks of target genes (*HaGAS1/2*, *HaGAO1/2*, *HaCOS*, *HaG8H*, *HaES*) and their partners under ethylene, SA, MeJA, and PEG treatments in sunflower. Yellow: target genes; orange: co-expressed genes

جدول ۱. پرایمرهای استفاده‌شده برای qRT-PCR در آفتابگردان

Table 1. Primers used for qRT-PCR analysis in sunflower

Gene	Primer (5'-3')	Ta(°C)	Reference
<i>HaGAS1</i>	GTGGGACATTAGTGCTATGAATCAA TCACCCATTCCCACTAAAGCA	60	–
<i>HaGAO1</i>	CCGCCCAACGGAAGATACTC GATCCCGAATACTGGAAGACGC	60	Frey et al. 2018
<i>HaG8H</i>	TACGTTAGGCGATGTTAGCGAAGAC CACGTGGTCTACTTCTGTGTCCCTCAA	64	Frey et al. 2018
<i>HaCOS</i>	GATACTTATAAATGCGTGGGCTTGTG CGGCCCAACGGAAGAACTC	64	Frey et al. 2018
<i>Actin2</i>	AACTATTATGTAAGACTGGCAGAC TCACAACCACTCTCCAACTAC	60	–
<i>LOC110928784</i>	TGCCCCATCCTTTCTGCTA TGGCCAAGCTTCTAAGCACT	59	–
<i>LOC110893694</i>	TAGGGCGGTGAACAGCATAC ACCTGGTACATGCGGGAATC	60	–

عملکردی بالقوه میان ژن‌های جدید و *HaCOS* باشد (شکل B-۲).

شناسایی ژن‌های کاندید جدید با فعالیت احتمال DBR2 در آفتابگردان

DBR2^۱ یک آنزیم کلیدی در بیوسنتز سزکویی‌ترین لاکتون‌های فعال زیستی است که کاهش پیوند دوگانه خارج حلقه‌ای در موقعیت دلتا ۱۱ (۱۳) پیش‌سازهای سزکویی‌ترین لاکتون‌ها را کاتالیز می‌کند و این امر موجب تنوع ساختاری و تغییر مسیر جریان متابولیک می‌شود. در *Artemisia annua*, *AaDBR2* آلدئیدآرتیمیزینیک را به آلدئیددی‌هیدروآرتیمیزینیک تبدیل می‌کند که پیش‌ساز آرتیمیزین است (Zhang et al., 2008). همچنین مطالعات دیگری نشان داده‌اند که آنزیم DBR2 در گونه‌های مختلف خانواده کاسنیان نقش کلیدی در تبدیل کاستونولید و پارتولید به ترتیب به دی‌هیدروکاستونولید در *C. intybus* و دی‌هیدروپارتولید در *T. parthenium* ایفا می‌کند (Kashkooli et al., 2019). در این پژوهش، دو ژن کاندید به نام‌های LOC110886996 و LOC110893694 به‌عنوان همولوگ‌های احتمالی *DBR2* در آفتابگردان شناسایی شدند. تحلیل شباهت توالی اسیدهای آمینه نشان داد که LOC110893696 بین ۸۲/۵۱ تا ۸۶/۹۵ درصد و LOC110886996 بین ۸۱/۷۵ تا ۸۴/۸۷ درصد با گونه‌های مختلف خانواده کاسنیان مشابهت دارند. بیشترین شباهت هر دو ژن با *T. cinerariifolium* و کمترین شباهت با *Erigeron canadensis* مشاهده شد (جدول ۲). علاوه بر این، هر دو ژن شباهت قابل توجهی با *AaDBR2* از *A. annua* نشان دادند (به ترتیب ۸۵/۶ و ۸۲/۹۴ درصد). نکته قابل توجه آن است که این دو ژن برخلاف سایر ژن‌های کاندید، هیچ شباهت معناداری یا *T. parthenium* نداشتند که احتمالاً ناشی از واگرایی مسیرهای اختصاصی گونه، تنوع ژنتیکی یا کمبود داده‌های حاشیه‌نویسی است. این یافته‌ها بر ضرورت

یافته‌های Frey و همکاران (2020) نیز نشان می‌دهد که توالی پروتئینی *HaCOS* شباهت بیشتری به *HaG8H* (*CYP71BL1*) دارد تا سنتازهای شناخته‌شده دیگر کاستونولید، که این موضوع از احتمال واگرایی عملکردی *HaCOS* حمایت می‌کند (Frey et al., 2020). این واگرایی عملکردی ممکن است ناشی از زیروظیفه‌ای شدن (subfunctionalization) یا نووظیفه‌ای شدن (neofunctionalization) در خانواده (*CYP71BL*) باشد، که تحت تأثیر انتخاب طبیعی و فشارهای اکولوژیکی شکل گرفته است (Moore et al., 2019).

مطابقت با یافته‌های پیشین درباره وجود چندین پاراگ عملکردی متمایز ژن‌های *HaGAS* (*HaGAS1*) تا *HaGAS3* (Göpfert et al., 2010) نشان می‌دهد که مسیر بیوسنتز سزکویی‌ترین لاکتون‌ها ممکن است ویژگی‌های بافتی یا وابسته به شرایط خاص داشته باشد. در نتیجه، تکثیر و واگرایی ژنی به نظر می‌رسد که اساس تنوع ساختاری ترکیبات گویانولید، مانند کاستونولید و یوپاتولید در آفتابگردان باشد. این یافته‌ها، پیچیدگی بیوشیمیایی و تکاملی مسیرهای سزکویی‌ترین لاکتون‌ها را برجسته کرده و اهداف امیدوارکننده‌ای برای مطالعات عملکردی آینده ارائه می‌دهند که می‌توان آن‌ها را با استفاده از ویرایش ژن و متابولومیکس بررسی کرد.

بررسی ساختار اگزون-اینترون ۳ ژن *HaCOS*، LOC110928784 و LOC110928786 (شکل A-۲) نشان داد که هر یک تنها دارای یک و دو، اگزون و اینترون به ترتیب هستند؛ موضوعی که بیانگر معماری ساده این ژن‌هاست. به‌منظور شناسایی نواحی حفاظت‌شده درگیر در بیوسنتز کاستونولید، تحلیل موتیف با نرم‌افزار MEME Suite انجام شد. در مجموع ۱۵ موتیف متمایز با طولی بین ۱۱ تا ۵۰ اسیدآمینه شناسایی گردید. نتایج نشان داد که موتیف‌های ۱۴ و ۱۵ در هیچ‌یک از ژن‌ها حضور ندارند. از سوی دیگر، موتیف ۱۲ تنها در ژن‌های LOC110928784 و LOC110928786 مشاهده شد و در *HaCOS* غایب بود. این تفاوت در توزیع موتیف‌ها می‌تواند بیانگر واگرایی

مورد تحلیل قرار گرفتند. در برگ‌ها، چهار ژن *HaGAS1*، *HaGAO1*، *HaCOS* و *HaG8H* سطح بیان به‌طور معناداری بالاتری نسبت به ریشه نشان دادند، به‌طوری‌که *HaGAO1* بیشترین میزان رونویسی را داشت و نقش کلیدی آن در مراحل اولیه بیوسنتز سزکویی‌ترین لاکتون‌ها در برگ‌ها را برجسته می‌کند. این نتایج با یافته‌های پیشین مطابقت دارد (Göpfert et al., 2010; Spring et al., 2020) و نقش تریکوم‌های غده‌ای به‌عنوان مکان‌های اصلی سنتز سزکویی‌ترین لاکتون‌ها را تأیید می‌کند (Ikezawa et al., 2011).

در مقابل، ژن‌های LOC110928784 و LOC110893694 بیان بالاتری در ریشه‌ها داشتند (شکل ۳)، که نشان‌دهنده دخالت آن‌ها در مراحل میانی بیوسنتزی و تولید پیش‌سازهای ترکیباتی مانند ۸-پی گزانتاتین، تومنتوزین و دهیدروکاستوسولاکتون است و با تجمع این ترکیبات در بافت ریشه همخوانی دارد (Raupp & Spring, 2013; Spring et al., 2020; Wu et al., 2022).

اعتبارسنجی عملکردی این ژن‌های کاندید برای تأیید نقش آن‌ها در بیوسنتز سزکویی‌ترین لاکتون‌ها در آفتابگردان تأکید دارند.

بررسی ساختار ژنی نشان داد که هر دو ژن شامل ۵ اگزون و ۴ اینترون هستند (شکل A-۲). همچنین تحلیل موتیف‌های حفاظت‌شده نشان داد که این دو ژن تنها دارای ۳ موتیف (۱۱، ۱۳ و ۱۵) هستند و این تعداد کمترین میزان بود (شکل B-۲). این الگوی توزیع منحصربه‌فرد موتیف‌ها، احتمال عملکرد ویژه این ژن‌ها را در مقایسه با سایر اعضای خانواده ژنی تقویت می‌کند.

الگوهای بیان ژن‌های درگیر در بیوسنتز سزکویی‌ترین لاکتون‌ها در برگ و ریشه آفتابگردان برای بررسی الگوهای بیان ژن‌های مرتبط با بیوسنتز سزکویی‌ترین لاکتون‌ها، ۶ ژن کاندید (*HaGAS1*، *HaGAO1*، *HaG8H*، *HaCOS*، LOC110928784 و LOC110893694) در بافت‌های برگ و ریشه‌ی نشاهای دو هفته‌ای آفتابگردان با استفاده از qRT PCR

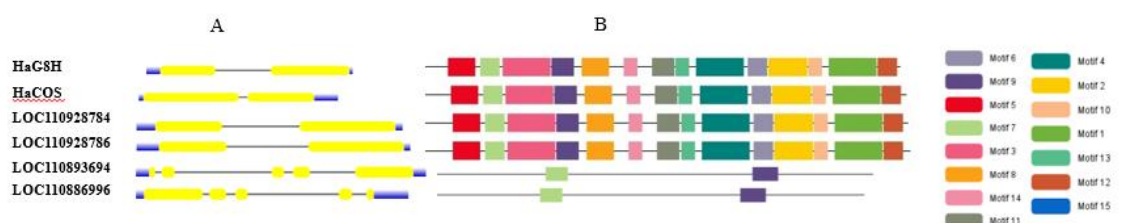
جدول ۲. درصد همسانی آمینواسیدی ژن‌های کاندیدای آفتابگردان با ارتولوگ‌های خانواده کاسنیان (BLAST, E < 0.05)

Table 2. Amino acid sequence identity between sunflower candidate genes and their orthologs in Asteraceae species (BLAST, E < 0.05)

Species	<i>Cichorium intybus</i>	<i>Cynara cardunculus</i> var. <i>scolymus</i>	<i>Tanacetum parthenium</i>	<i>Tanacetum cinerariifolium</i>	<i>Lactuca sativa</i>	<i>Erigeron canadensis</i>	<i>Artemisia annua</i>
Genes							
HaGAS1	67.03	69.29	84.55	84.55	88.73	64.75	84.55
HaGAS2	67.58	70.79	84.55	84.55	88.1	65.31	84.55
HaGAO1	89.34	83.68	89.14	53.03	89.34	50.81	89.14
HaGAO2	63.35	60.79	62.28	54.79	63.35	58.7	62.28
HaCOS	62.37	62.17	61.35	61.35	61.99	56.25	65.24
HaG8H	67.35	66.6	66.46	66.06	66.74	57.32	66.6
LOC110928784	64.8	63.78	62.75	62.75	63.75	57.78	63.91
LOC110928786	64.77	63.18	62.75	62.55	63.75	58.38	63.88
LOC110893694	84.48	84.18	-	86.95	83.67	82.51	84.9
LOC110886996	83.63	83.6	-	84.87	82.82	81.75	82.25

A dash (-) denotes no significant similarity

- نشان‌دهنده نبود شباهت معنادار



شکل ۲. A) سازمان دهی اگزون-اینترون (آبی: نواحی غیرترجمه، زرد: اگزون‌ها، خطوط سیاه: اینترون‌ها). **B)** موتیف‌های حفاظت‌شده شناسایی‌شده با MEME (جعبه‌های رنگی نشان‌دهنده موتیف‌های متمایز).

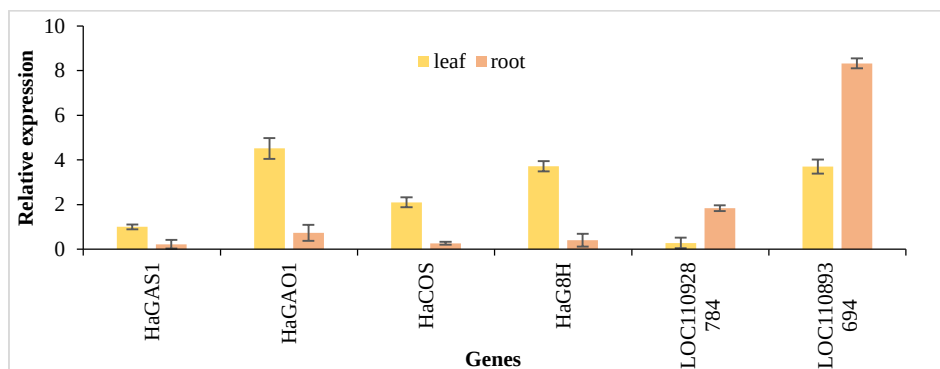
Figure 2. A) Exon-intron organization: blue, untranslated regions; yellow, exons; black, introns. B) Conserved motifs identified using MEME, with colored boxes representing distinct motifs

تحلیل عناصر تنظیمی وابسته به پروموتور ژن‌های کلیدی مسیر سزکویی ترپن لاکتون در آفتابگردان ناحیه ۲ کیلوباز بالادست پروموتور ژن‌های *GAS1/2*، *GAO1/2*، *COS*، *G8H* و *ES* با پایگاه PlantCARE بررسی شد تا عناصر تنظیمی سیس کلیدی شامل *bZIP*، *GCC-box*، *G-box*، *W-box* و *CBF2/RAA* شناسایی گردیدند که قبلاً به عنوان جایگاه اتصال عوامل رونویسی خانواده‌های *WRKY*، *ERF* و *bZIP* تأیید شده‌اند (شکل ۴) (Matías-*et al.*, 2017; Shen *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2023; Wu *et al.*, 2021; Zhang *et al.*, 2015).

تحلیل پروموتور نشان داد (شکل ۴) که موتیف‌های *W-box* در تمام ژن‌ها به جز *HaES* (۲-۱۱ جایگاه) حضور دارند. *G-box*‌ها در همه ژن‌ها به جز *HaGAO1* شناسایی شدند، در حالیکه موتیف‌های *GCC-box* محدود به *HaGAO2* و *HaG8H* بودند. موتیف‌های *bZIP* در *HaGAS1*، *HaGAO2*، *HaCOS*، *HaG8H* و *HaES* حضور داشت. این نتایج نشان‌دهنده ساختار پیچیده و اختصاصی موتیف‌های تنظیمی سیس در ژن‌های مسیر سزکویی‌ترین لاکتون‌هاست که بیان ژن‌ها را تحت تأثیر قرار داده و پاسخ به هورمون‌ها، سیگنال‌های رشدی و عوامل محیطی را تنظیم می‌کند. این داده‌ها چارچوب جامعی برای تحلیل عملکردی و مهندسی ژنتیکی هدفمند مسیر سزکویی‌ترین لاکتون‌ها در آفتابگردان فراهم می‌آورند.

مطالعات پیشین نشان داده‌اند که کلاس‌های مختلف سزکویی‌ترین لاکتون‌ها در بافت‌های متمایز سنتز و ذخیره می‌شوند؛ به گونه‌ای که جرماکرونولیدها و هاگتانولیدها در تریکوم‌ها و ۸-پی‌گزانتاتین و دهیدروکاستوس لاکتون‌ها عمدتاً در ریشه‌ها تجمع می‌یابند (Spring, 2021; Spring *et al.*, 2020). این تفاوت‌های مکانی، وجود مسیرهای بیوسنتزی بافت‌محور و وابسته به محیط آنزیمی ویژه را نشان می‌دهد.

حمایت از این یافته‌ها توسط Frey و همکاران (2019) ارائه شد؛ آن‌ها دو مسیر جداگانه برای بیوسنتز اوپاتولید شناسایی کردند: یکی از طریق کاستونولید با مشارکت *CYP71BL9* و *HaG8H* و دیگری تبدیل مستقیم ۸- β هیدروکسی جرماکریل A اسید به اوپاتولید توسط *HaES*. در این مسیر، ۸- β هیدروکسی جرماکریل A اسید به عنوان نقطه انشعاب متابولیک عمل می‌کند که منجر به تولید مشتقات موجود در تریکوم‌ها یا ریشه می‌شود و اهمیت زمینه آنزیمی و مکان‌یابی بافتی را برجسته می‌کند (Frey *et al.*, 2019; Frey *et al.*, 2018). به طور کلی، الگوهای بیان ژنی نشان می‌دهند که مسیر سزکویی‌ترین لاکتون‌های کانونیکال در ریشه‌ها فعالیت کمتری دارد و مسیرهای جایگزین و تخصصی غالب هستند. درک دقیق این مسیرها برای مهندسی متابولیک هدفمند و افزایش تولید سزکویی‌ترین لاکتون‌ها در آفتابگردان ضروری است و می‌تواند راه را برای بهینه‌سازی بیوتکنولوژیک تولید این ترکیبات هموار کند.



شکل ۳. الگوهای بیان شش ژن مسیر سزکویی‌ترین لاکتون‌ها در ریشه و برگ بررسی شده با qRT-PCR (*HaGAS1* در برگ به عنوان مرجع) **Figure 3.** Expression patterns of six sesquiterpene lactone pathway genes in root and leaf tissues were analyzed by qRT-PCR (*HaGAS1* in leaf used as reference).

می‌کند (Illescas-Miranda *et al.*, 2025; Ortiz-Espín *et al.*, 2017). همچنین، ژن XP_022023437.1 با AT5G11260 هم‌خانواده است که عملکرد گروه HY5 را دارد و رشد، جوانه‌زنی، پاسخ به تنش‌ها و تجمع آنتوسیانین در پاسخ به نور را تنظیم می‌کند (Bhagat *et al.*, 2021; Qiu *et al.*, 2019).

مطالعات پیشین نشان داده‌اند که *AaHY5* مستقیماً به توالی G-box در پروموتور *AaGSW1* متصل شده و مسیر بیوسنتز آرتیمیزین را به‌طور غیرمستقیم تنظیم می‌کند. علاوه بر این، *AabZIP9* به توالی‌های DNA دارای هسته ACGT در پروموتورهای *ADS* و *CYP71A1* متصل شده و تولید آرتیمیزین را افزایش می‌دهد. در آنالیز پروموتوری این مطالعه مشاهده شد (شکل ۴) که ژن‌های *HaGAS2* و *HaG8H* به‌ترتیب دارای ۱ و ۲ جایگاه G-box هستند و پروموتورهای *HaGAS2*، *HaGAO1* و *HaG8H* به‌ترتیب دارای ۱، ۳ و ۳ جایگاه احتمالی اتصال *bZIP9* می‌باشند.

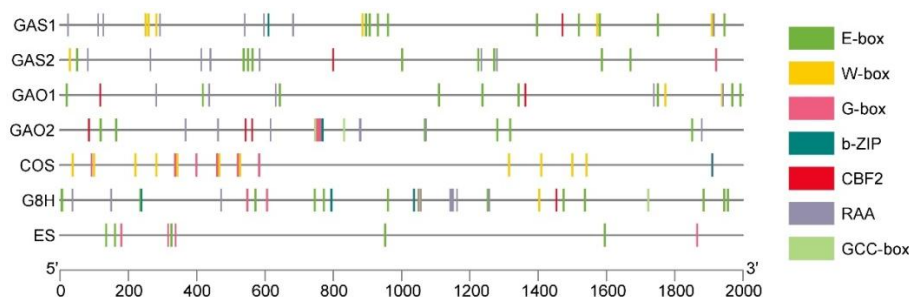
بر اساس نتایج این مطالعه، XP_022029119.1 و XP_022023437.1 در آفتابگردان با AT5G24800 و AT5G11260 هم‌خوشه شدند، مشابه *AaHY5* و *AabZIP9* در *A. annua* (Hao *et al.*, 2019; Xiang *et al.*, 2022). این یافته‌ها نشان می‌دهند که این ژن‌ها احتمالاً نقش کلیدی در تنظیم مسیر بیوسنتز سزکویی‌ترین لاکتون‌ها دارند و مکانیسم‌های تنظیمی *bZIP* در گیاهان مختلف تا حد زیادی حفظ شده‌اند. با این حال، تعیین نقش دقیق آن‌ها نیازمند آزمایش‌های تعیین عملکرد در سیستم هیبریدی مخمر است.

شناسایی فاکتورهای رونویسی هم‌بیان با ژن‌های کلیدی مسیر بیوسنتز سزکویی‌ترین لاکتون‌ها در آفتابگردان

تحلیل شبکه هم‌بیانی ژنی ۵ ژن *bZIP* و ۱۲ ژن *ERF* به‌عنوان فاکتورهای رونویسی هم‌بیان با ژن‌های کلیدی مسیر بیوسنتز سزکویی‌ترین لاکتون‌ها در آفتابگردان شناسایی کرد (شکل ۱). برای ارزیابی روابط تکاملی و نقش‌های احتمالی این ژن‌ها، تحلیل فیلوژنتیک بر اساس توالی‌های آمینواسیدی ۱۲۷ ژن *bZIP* و ۱۳۹ ژن *ERF* در آرکیدوپسیس همراه با ژن‌های کاندیدای آفتابگردان انجام شد. نتایج فیلوژنتیک نشان داد که ژن‌های کاندیدا در خوشه‌های همولوگ با ژن‌های شناخته‌شده آرکیدوپسیس قرار دارند، که این امر بیانگر حفاظت عملکردی میان گونه‌ها است. بر این اساس، ژن‌های شناسایی شده می‌توانند به‌عنوان تنظیم‌کننده‌های کلیدی در مسیر بیوسنتز سزکویی‌ترین لاکتون‌ها عمل کنند.

شناسایی همولوگ‌های *bZIP* مرتبط با تنظیم

بیوسنتز سزکویی‌ترین لاکتون‌ها در آفتابگردان بازسازی درخت فیلوژنتیک نشان داد (شکل ۵) که ژن XP_021983768.1 در یک خوشه با ژن AT1G75319 قرار دارد که در جوانه‌زنی بذر، سنتز نیکوتیانامین و تحمل به کمبود آهن نقش دارد (Iglesias-Fernández *et al.*, 2013; Wu *et al.*, 2024). ژن XP_022029119.1 با AT5G24800 خوشه‌بندی شد که فرآیندهایی از جمله رشد اولیه گیاهچه‌ها، افزایش تحمل به تنش شوری و تنظیم رونویسی ژن‌های مرتبط با بذر و میوه را کنترل



شکل ۴. توزیع و جایگاه عناصر تنظیمی سیس در نواحی پروموتور ژن‌های مسیر سزکویی‌ترین لاکتون‌ها

Figure 4. Distribution and positions of cis-regulatory elements in the promoter regions of sesquiterpene lactone pathway genes

و ۱ جایگاه GCC-box بودند، که نشان‌دهنده یک الگوی محافظت‌شده و محدود از این موتیف در مسیر سزکویی‌ترین لاکتون‌ها است.

مقایسه تطبیقی با گونه‌های دیگر نشان داد که ژن XP_021969365.1 عملکردی مشابه *SmERF73* دارد و ژن‌های XP_022017763.1 و XP_022002255.1 الگوهای مشابه *AaORA* و *AaERF1* در *A. annua* نشان دادند که در افزایش تولید آرتمیزینین مؤثر هستند. این یافته‌ها نشان می‌دهند که ژن‌های XP_021969365.1، XP_022017763.1 و XP_022002255.1 احتمالاً به‌عنوان تنظیم‌کننده‌های کلیدی مسیر بیوسنتز سزکویی‌ترین لاکتون در آفتابگردان عمل می‌کنند و حفظ الگوهای تنظیمی ERF در گونه‌های گیاهی مختلف را تأیید می‌کنند.

الگوی بیان فاکتورهای رونویسی bZIP و ERF در پاسخ به تیمارهای هورمونی و تنشی

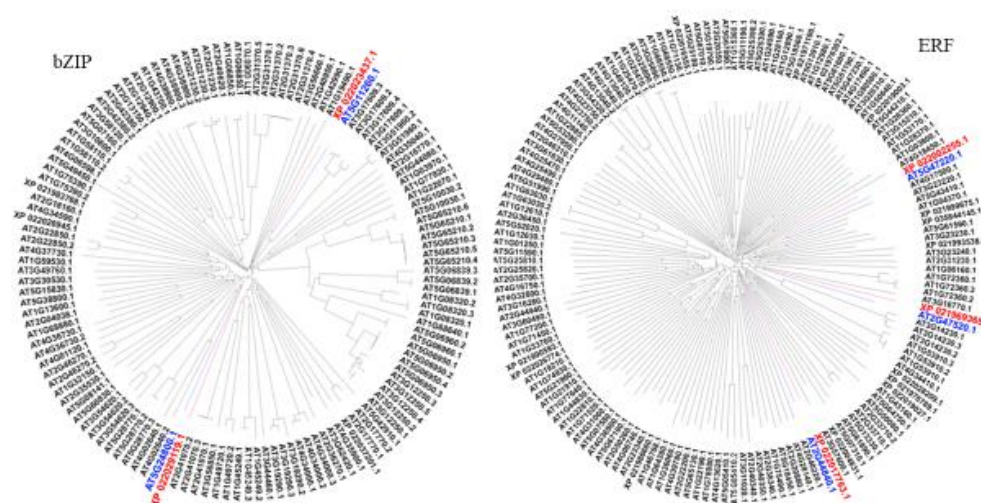
به‌منظور بررسی نقش فاکتورهای رونویسی در پاسخ گیاه به تیمارهای هورمونی و تنشی، الگوی بیان ژن‌های bZIP و ERF که از طریق تحلیل شبکه هم‌بیانی ژنی شناسایی شدند، مورد ارزیابی قرار گرفت (شکل ۶). در شرایط کنترل، ژن XP_021986660.1 بیان بسیار بالایی داشت و ۲ ژن XP_022023437.1 و XP_022029119.1 بیان متوسطی نشان دادند. در مقابل، تیمار اتیلن بیشترین تغییرات را القا نمود؛ به‌طوری‌که ژن‌های XP_021986660.1، XP_022017763.1 و XP_021993538.1 از خانواده ERF بیان بسیار بالایی نشان داده و در مقایسه با سایر تیمارها بیشترین القا را تجربه کردند. این یافته‌ها بیانگر نقش کلیدی مسیر سیگنالینگ وابسته به اتیلن در تنظیم عوامل رونویسی مرتبط با پاسخ‌های دفاعی است.

تیمار پلی‌اتیلن‌گلیکول عمدتاً باعث تغییرات متوسط بیان در تعدادی از ژن‌های bZIP شد، در حالی که تیمار متیل‌جاسمونات افزایش نسبی بیان ژن‌های bZIP (XP_021983768.1، XP_022023437.1) و ERF (XP_021986660.1) را سبب گردید. این نتایج با

تحلیل فیلوژنتیک همولوگ‌های ERF مرتبط با تنظیم بیوسنتز سزکویی‌ترین لاکتون در آفتابگردان تحلیل فیلوژنتیک همولوگ‌های ERF در آفتابگردان نشان داد (شکل ۵) که ژن‌های XP_022017763.1، XP_021993538.1 و XP_021990593.1 به‌ترتیب با ژن‌های AT1G19210، AT2G44840 و AT3G23240 خوشه‌بندی شدند که در فرآیندهایی نظیر مهار رشد ریشه‌های جانبی، مقاومت به تنش‌های سرما، شوری و اسمزی و تجمع اکسین نقش دارند (Hu et al., 2018; Liao et al., 2024; Lv et al., 2021; Mao et al., 2016). ژن XP_021969365.1 با AT2G47520 هم‌خانواده شد که در افزایش مقاومت به *Fusarium graminearum* و تنظیم تعادل ROS دخیل است، درحالی‌که ژن XP_022002255.1 با AT5G47220 خوشه‌بندی شد که در مقاومت به *Stemphylium alternata* و *lycopersici* مؤثر است (Mao et al., 2016; Yao et al., 2017). همچنین ژن XP_022019003.1 با AT1G28360 هم‌خانواده گردید که در تنظیم رشد جنین، تشکیل گل و بذر و تعاملات میکوریزایی نقش دارد (Chandler & Werr, 2020; Xu et al., 2022). مطالعات پیشین نشان داده‌اند که *AaERF1* با اتصال به موتیف‌های CBF2 و RAA در پروموتورهای *ADS* و *CYP71AV1*، تولید آرتمیزینین را افزایش می‌دهد (Yu et al., 2012). تحلیل‌های ما نشان داد که برای موتیف CBF2، ژن‌های *HaGAS1*، *HaGAS2* و *HaG8H* هر کدام یک جایگاه و ژن‌های *HaGAO1* و *HaGAO2* به ترتیب ۲ و ۳ جایگاه دارند. برای موتیف RAA، ژن‌های *HaGAS1* و *HaGAS2* دارای ۹ جایگاه، *HaGAO1* دارای ۵ جایگاه، *HaGAO2* و *HaG8H* هر کدام ۸ جایگاه و *HaES* ۳ جایگاه شناسایی شد. در *S. miltiorrhiza*، SmERF73 عناصر پروموتری GCC-box ژن‌های مرتبط با بیوسنتز تانن‌سینون (*CPS1*، *DXR1*، *KSL1* و *CYP76AH3*) را شناسایی کرده و بیان آن‌ها را فعال می‌کند (Zheng et al., 2021). در تحلیل حاضر، تنها دو ژن آفتابگردان، *HaGAO2* و *HaG8H*، به‌ترتیب دارای ۲

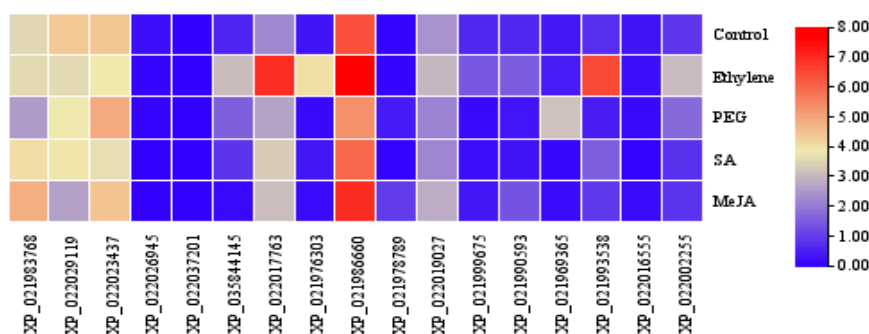
به‌طور کلی، نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که فاکتورهای رونویسی منتخب، به‌ویژه ژن‌های خانواده ERF، عمدتاً تحت تأثیر سیگنالینگ وابسته به اتیلن قرار دارند، در حالی که مسیرهای مرتبط با متیل جاسمونات و پلی‌اتیلن گلیکول نقش مکمل و مسیر سالیسیلیک اسید نقش بسیار محدودی در تنظیم آن‌ها ایفا می‌کند.

مطالعات پیشین همخوان است که نقش مکمل متیل جاسمونات در کنار اتیلن (Song *et al.*, 2019) و دخالت bZIP در سازگاری با خشکی را گزارش کرده‌اند (Castilhos *et al.*, 2014). در تیمار سالیسیلیک‌اسید نیز ژن XP_021986660.1 بیان متوسطی داشت و ژن‌های XP_022029119.1، XP_021983768.1 و XP_022023437.1 تغییرات اندکی نشان دادند.



شکل ۵. درخت فیلوژنتیک ژن‌های فاکتورهای رونویسی bZIP و ERF در آفتابگردان و همولوگ‌های آرابیدوپسیس بر اساس توالی کامل آمینواسیدی، با خوشه‌بندی مرتبط با مسیرهای متابولیک کلیدی و نقش احتمالی در بیوسنتز سزکویی‌ترین لاکتون‌ها. شاخه‌های قرمز ژن‌های آفتابگردان و شاخه‌های آبی همولوگ‌های آرابیدوپسیس را نشان می‌دهند.

Figure 5. Phylogenetic tree of bZIP and ERF transcription factor genes in sunflower and their Arabidopsis homologs based on full-length amino acid sequences, clustered according to key metabolic pathways with potential roles in sesquiterpene lactone biosynthesis. Red branches indicate sunflower genes, and Blue branches indicate Arabidopsis homologs



شکل ۶. نقشه حرارتی بیان ژن‌های فاکتوررونویسی در ریشه‌های آفتابگردان در پاسخ به تیمارهای اتیلن، سالیسیلیک اسید، متیل جاسمونات و پلی‌اتیلن گلیکول، و رنگ‌های آبی، کرم و قرمز به ترتیب بیان کم، متوسط و زیاد را نشان می‌دهند

Figure 6. Heatmap of transcription factor gene expression in sunflower roots in response to ethylene, salicylic acid, methyl jasmonate, and polyethylene glycol treatments. Blue, cream, and red indicate low, medium, and high expression levels, respectively.

این یافته‌ها نه تنها درک عمیق‌تری از میانی مولکولی و تکاملی بیوسنتز سزکویی‌ترین لاکتون‌ها فراهم می‌آورند، بلکه اهداف ارزشمندی برای مطالعات عملکردی آینده و مهندسی متابولیک در راستای بهینه‌سازی تولید ترکیبات فعال زیستی در آفتابگردان معرفی می‌کنند.

تعارض منافع

هیچ‌گونه تعارض منافع توسط نویسندگان وجود ندارد.

این پژوهش با بهره‌گیری از شبکه‌های هم‌بیانی ژنی و تحلیل‌های فیلوژنتیک مجموعه‌ای از ژن‌های کاندید و فاکتورهای رونویسی مرتبط با مسیر بیوسنتز سزکویی‌ترین لاکتون‌ها در آفتابگردان را شناسایی کرد. شناسایی ژن‌های جدید از خانواده‌های CYP450 و DBR2 در کنار فاکتورهای رونویسی bZIP و ERF همولوگ با ژن‌های شناخته‌شده در گونه‌های دارویی، نشان‌دهنده نقش تکثیر و واگرایی ژنی و نیز حفاظت مکانیسم‌های تنظیمی میان گونه‌ها است. در مجموع،

منابع

- Bhagat, P. K., Verma, D., Sharma, D., & Sinha, A. K. (2021). HY5 and ABI5 transcription factors physically interact to fine tune light and ABA signaling in Arabidopsis. *Plant molecular biology*, 107(1), 117-127.
- Castilhos, G., Lazzarotto, F., Spagnolo-Fonini, L., Bodanese-Zanettini, M. H., & Margis-Pinheiro, M. (2014). Possible roles of basic helix-loop-helix transcription factors in adaptation to drought. *Plant science*, 223, 1-7.
- Chandler, J., & Werr, W. (2020). A phylogenetically conserved APETALA2/ethylene response factor, ERF12, regulates arabidopsis floral development. *Plant molecular biology*, 102(1), 39-54.
- Chen, C., Chen, H., Zhang, Y., Thomas, H. R., Frank, M. H., He, Y., & Xia, R. (2020). TBtools: an integrative toolkit developed for interactive analyses of big biological data. *Molecular plant*, 13(8), 1194-1202.
- Chen, M., Yan, T., Shen, Q., Lu, X., Pan, Q., Huang, Y., Tang, Y., Fu, X., Liu, M., & Jiang, W. (2017). GLANDULAR TRICHOME-SPECIFIC WRKY 1 promotes artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua*. *New Phytologist*, 214(1), 304-316.
- Eidi, M., Abdolalizadeh, S., Nasirpour, M. H., Zahiri, J., & Garshasbi, M. (2024). 123FASTQ: an intuitive and efficient tool for preprocessing Illumina FASTQ reads. *bioRxiv*, 2024.2003.2008.584032.
- Fasoli, B., Lin, J. C., Bowling, D. R., Mitchell, L., & Mendoza, D. (2018). Simulating atmospheric tracer concentrations for spatially distributed receptors: updates to the Stochastic Time-Inverted Lagrangian Transport model's R interface (STILT-R version 2). *Geoscientific Model Development*, 11(7), 2813-2824.
- Fernández-Aparicio, M., Del Moral, L., Muños, S., Velasco, L., & Pérez-Vich, B. (2022). Genetic and physiological characterization of sunflower resistance provided by the wild-derived Or Deb2 gene against highly virulent races of *Orobanche cumana* Wallr. *Theoretical and Applied Genetics*, 135(2), 501-525.
- Frey, M., Klaiber, I., Conrad, J., Bersch, A., Pateraki, I., Ro, D.-K., & Spring, O. (2019). Characterization of CYP71AX36 from sunflower (*Helianthus annuus* L., Asteraceae). *Scientific Reports*, 9(1), 14295.
- Frey, M., Klaiber, I., Conrad, J., & Spring, O. (2020). CYP71BL9, the missing link in costunolide synthesis of sunflower. *Phytochemistry*, 177, 112430.
- Frey, M., Schmauder, K., Pateraki, I., & Spring, O. (2018). Biosynthesis of Eupatolide—A metabolic route for sesquiterpene lactone formation involving the P450 enzyme CYP71DD6. *ACS Chemical Biology*, 13(6), 1536-1543.
- Göpfert, J., Bülow, A.-K., & Spring, O. (2010). Identification and functional characterization of a new sunflower germacrene A synthase (HaGAS3). *Natural Product Communications*, 5(5), 1934578X1000500507.
- Hao, X., Zhong, Y., N tzmman, H.-W., Fu, X., Yan, T., Shen, Q., Chen, M., Ma, Y., Zhao, J., & Osbourn, A. (2019). Light-induced artemisinin biosynthesis is regulated by the bZIP transcription factor AaHY5 in *Artemisia annua*. *Plant and Cell Physiology*, 60(8), 1747-1760.
- Hu, X., Xu, X., & Li, C. (2018). Ectopic expression of the LoERF017 transcription factor from *Larix olgensis* Henry enhances salt and osmotic-stress tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Biotechnology Reports*, 12(2), 93-104.

- Iglesias-Fernández, R., Barrero-Sicilia, C., Carrillo-Barral, N., Oñate-Sánchez, L., & Carbonero, P. (2013). Arabidopsis thaliana bZIP 44: a transcription factor affecting seed germination and expression of the mannanase-encoding gene AtMAN7. *The Plant Journal*, 74(5), 767-780.
- Ikezawa, N., Göpfert, J. C., Nguyen, D. T., Kim, S.-U., O'Maille, P. E., Spring, O., & Ro, D.-K. (2011). Lettuce costunolide synthase (CYP71BL2) and its homolog (CYP71BL1) from sunflower catalyze distinct regio- and stereoselective hydroxylations in sesquiterpene lactone metabolism. *Journal of Biological Chemistry*, 286(24), 21601-21611.
- Illescas-Miranda, J., Llanos-Casado, V., Contreras, E., Carrillo-Barral, N., & Iglesias-Fernández, R. (2025). Temporal and spatial expression analysis of AtbZIP9 during seed and silique development in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Plant Gene*, 100536.
- Kashkooli, A. B., van der Krol, A. R., Rabe, P., Dickschat, J. S., & Bouwmeester, H. (2019). Substrate promiscuity of enzymes from the sesquiterpene biosynthetic pathways from *Artemisia annua* and *Tanacetum parthenium* allows for novel combinatorial sesquiterpene production. *Metabolic engineering*, 54, 12-23.
- Kim, D., Paggi, J. M., Park, C., Bennett, C., & Salzberg, S. L. (2019). Graph-based genome alignment and genotyping with HISAT2 and HISAT-genotype. *Nature biotechnology*, 37(8), 907-915.
- Li, H., Handsaker, B., Wysoker, A., Fennell, T., Ruan, J., Homer, N., Marth, G., Abecasis, G., Durbin, R., & Subgroup, G. P. D. P. (2009). The sequence alignment/map format and SAMtools. *Bioinformatics*, 25(16), 2078-2079.
- Li, J., Sima, W., Ouyang, B., Wang, T., Ziaf, K., Luo, Z., Liu, L., Li, H., Chen, M., & Huang, Y. (2012). Tomato SIDREB gene restricts leaf expansion and internode elongation by downregulating key genes for gibberellin biosynthesis. *Journal of Experimental Botany*, 63(18), 6407-6420.
- Li, S., Wang, H., Li, F., Chen, Z., Li, X., Zhu, L., Wang, G., Yu, J., Huang, D., & Lang, Z. (2015). The maize transcription factor EREB 58 mediates the jasmonate-induced production of sesquiterpene volatiles. *The Plant Journal*, 84(2), 296-308.
- Liao, Y., Liu, X., Xu, N., Chen, G., Qiao, X., Gu, Q., Wang, Y., & Sun, J. (2024). Fine mapping and identification of ERF transcription factor ERF017 as a candidate gene for cold tolerance in pumpkin. *Theoretical and Applied Genetics*, 137(10), 230.
- Liao, Y., Smyth, G. K., & Shi, W. (2014). featureCounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. *Bioinformatics*, 30(7), 923-930.
- Lv, B., Wei, K., Hu, K., Tian, T., Zhang, F., Yu, Z., Zhang, D., Su, Y., Sang, Y., & Zhang, X. (2021). MPK14-mediated auxin signaling controls lateral root development via ERF13-regulated very-long-chain fatty acid biosynthesis. *Molecular plant*, 14(2), 285-297.
- Majdi, M., Ashengroph, M., & Abdollahi, M. R. (2016). Sesquiterpene lactone engineering in microbial and plant platforms: parthenolide and artemisinin as case studies. *Applied microbiology and biotechnology*, 100(3), 1041-1059.
- Mao, J.-L., Miao, Z.-Q., Wang, Z., Yu, L.-H., Cai, X.-T., & Xiang, C.-B. (2016). Arabidopsis ERF1 mediates cross-talk between ethylene and auxin biosynthesis during primary root elongation by regulating ASA1 expression. *PLoS genetics*, 12(1), e1005760.
- Maqsood, H., Munir, F., Amir, R., & Gul, A. (2022). Genome-wide identification, comprehensive characterization of transcription factors, cis-regulatory elements, protein homology, and protein interaction network of DREB gene family in *Solanum lycopersicum*. *Frontiers in Plant Science*, 13, 1031679.
- Matías-Hernández, L., Jiang, W., Yang, K., Tang, K., Brodelius, P. E., & Pelaz, S. (2017). Aa MYB 1 and its orthologue At MYB 61 affect terpene metabolism and trichome development in *Artemisia annua* and *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 90(3), 520-534.
- Moore, B. M., Wang, P., Fan, P., Leong, B., Schenck, C. A., Lloyd, J. P., Lehti-Shiu, M. D., Last, R. L., Pichersky, E., & Shiu, S.-H. (2019). Robust predictions of specialized metabolism genes through machine learning. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 116(6), 2344-2353.
- Ortiz-Espín, A., Iglesias-Fernández, R., Calderón, A., Carbonero, P., Sevilla, F., & Jiménez, A. (2017). Mitochondrial AtTrxo1 is transcriptionally regulated by AtbZIP9 and AtAZF2 and affects seed germination under saline conditions. *Journal of Experimental Botany*, 68(5), 1025-1038.
- Qiu, Z., Wang, H., Li, D., Yu, B., Hui, Q., Yan, S., Huang, Z., Cui, X., & Cao, B. (2019). Identification of candidate HY5-dependent and-independent regulators of anthocyanin biosynthesis in tomato. *Plant and Cell Physiology*, 60(3), 643-656.
- Raupp, F. M., & Spring, O. (2013). New sesquiterpene lactones from sunflower root exudate as germination stimulants for *Orobancha cumana*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(44), 10481-10487.

- Shen, Q., Lu, X., Yan, T., Fu, X., Lv, Z., Zhang, F., Pan, Q., Wang, G., Sun, X., & Tang, K. (2016). The jasmonate-responsive Aa MYC 2 transcription factor positively regulates artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua*. *New Phytologist*, 210(4), 1269-1281.
- Song, N., Ma, L., Wang, W., Sun, H., Wang, L., Baldwin, I. T., & Wu, J. (2019). An ERF2-like transcription factor regulates production of the defense sesquiterpene capsidiol upon *Alternaria alternata* infection. *Journal of Experimental Botany*, 70(20), 5895-5908.
- Spring, O. (2021). Sesquiterpene lactones in sunflower oil. *Lwt*, 142, 111047.
- Spring, O., Schmauder, K., Lackus, N. D., Schreiner, J., Meier, C., Wellhausen, J., Smith, L. V., & Frey, M. (2020). Spatial and developmental synthesis of endogenous sesquiterpene lactones supports function in growth regulation of sunflower. *Planta*, 252(1), 2.
- Wang, X., Sun, W., Fang, S., Dong, B., Li, J., Lv, Z., Li, W., & Chen, W. (2023). AaWRKY6 contributes to artemisinin accumulation during growth in *Artemisia annua*. *Plant science*, 335, 111789.
- Wu, W., Huang, H., Su, J., Yun, X., Zhang, Y., Wei, S., Huang, Z., Zhang, C., & Bai, Q. (2022). Dynamics of germination stimulants dehydrocostus lactone and costunolide in the root exudates and extracts of sunflower. *Plant Signaling & Behavior*, 17(1), 2025669.
- Wu, X., Jia, Y., Ma, Q., Wang, T., Xu, J., Chen, H., Wang, M., Song, H., & Cao, S. (2024). The transcription factor bZIP44 cooperates with MYB10 and MYB72 to regulate the response of *Arabidopsis thaliana* to iron deficiency stress. *New Phytologist*, 242(6), 2586-2603.
- Wu, Z., Li, L., Liu, H., Yan, X., Ma, Y., Li, Y., Chen, T., Wang, C., Xie, L., & Hao, X. (2021). AaMYB15, an R2R3-MYB TF in *Artemisia annua*, acts as a negative regulator of artemisinin biosynthesis. *Plant science*, 308, 110920.
- Xiang, L., He, P., Shu, G., Yuan, M., Wen, M., Lan, X., Liao, Z., & Tang, Y. (2022). AabHLH112, a bHLH transcription factor, positively regulates sesquiterpenes biosynthesis in *Artemisia annua*. *Frontiers in Plant Science*, 13, 973591.
- Xu, S., Hou, H., Wu, Z., Zhao, J., Zhang, F., Teng, R., Chen, F., & Teng, N. (2022). *Chrysanthemum* embryo development is negatively affected by a novel ERF transcription factor, CmERF12. *Journal of Experimental Botany*, 73(1), 197-212.
- Yao, Y., Chen, X., & Wu, A.-M. (2017). ERF-VII members exhibit synergistic and separate roles in Arabidopsis. *Plant Signaling & Behavior*, 12(6), e1329073.
- Yu, Z.-X., Li, J.-X., Yang, C.-Q., Hu, W.-L., Wang, L.-J., & Chen, X.-Y. (2012). The jasmonate-responsive AP2/ERF transcription factors AaERF1 and AaERF2 positively regulate artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua* L. *Molecular plant*, 5(2), 353-365.
- Zhang, F., Fu, X., Lv, Z., Lu, X., Shen, Q., Zhang, L., Zhu, M., Wang, G., Sun, X., & Liao, Z. (2015). A basic leucine zipper transcription factor, AabZIP1, connects abscisic acid signaling with artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua*. *Molecular plant*, 8(1), 163-175.
- Zhang, Y., Teoh, K. H., Reed, D. W., Maes, L., Goossens, A., Olson, D. J., Ross, A. R., & Covello, P. S. (2008). The molecular cloning of artemisinic aldehyde $\Delta 11$ (13) reductase and its role in glandular trichome-dependent biosynthesis of artemisinin in *Artemisia annua*. *Journal of Biological Chemistry*, 283(31), 21501-21508.
- Zheng, H., Jing, L., Jiang, X., Pu, C., Zhao, S., Yang, J., Guo, J., Cui, G., Tang, J., & Ma, Y. (2021). The ERF-VII transcription factor SmERF73 coordinately regulates tanshinone biosynthesis in response to stress elicitors in *Salvia miltiorrhiza*. *New Phytologist*, 231(5), 1940-1955.

A genome sequencing approach to identify candidate genes for drought tolerance in rice, using a drought-tolerant mutant

Banafsheh Fattah¹, Abdolreza Bagheri^{2*} , Ali Akbar Ebadi³, Alireza Seifi⁴

1. PhD Student, Department of Biotechnology and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.

2. Professor, Department of Biotechnology and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.

3. Associate Professor, Rice Research Institute of Iran (RRII), Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Rasht, Iran.

4. Associate Professor, Department of Biotechnology and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.

Correspondence:

Abdolreza Bagheri

Email: bagheriyazd@gmail.com

Received: 28, Dec. 2024

Accepted: 16, Sep. 2025

How to cite:

Fattah, B., Bagheri, A., Ebadi, A.A., & Seifi, A. (2025). A genome sequencing approach to identify candidate genes for drought tolerance in rice, using a drought-tolerant mutant. *Crop Biotechnology*, 15 (1), 63-78. (DOI: [10.30473/cb.2025.73217.1996](https://doi.org/10.30473/cb.2025.73217.1996))

ABSTRACT

Rice is a globally important food crop, and drought is a major constraint on its production, highlighting the need for drought-tolerant varieties. Next-generation sequencing (NGS) enables the identification of DNA variations, even within closely related rice lines, offering a powerful approach to unravel the genetic basis of traits like drought tolerance. Identifying single nucleotide polymorphisms (SNPs) and insertions/deletions (InDels) is a crucial application of NGS. This study aimed to identify candidate genes for drought tolerance by re-sequencing the genome of a drought-tolerant rice mutant and comparing it to its drought-sensitive parent, Hashemi. We identified 73,077 polymorphisms (SNPs and InDels) between the two lines. We then analyzed the segregation of large-effect variants in a segregating F2 population derived from a cross between the two lines, comparing drought-sensitive and drought-tolerant progeny. The identified SNPs were validated against previously reported SNPs, and their functional relevance was assessed based on their location within known quantitative trait loci (QTLs) and conserved protein domains. This research pinpoints a potentially valuable target gene for enhancing drought tolerance in rice breeding programs. It is hoped that by inducing targeted mutations or using genome editing techniques to produce this protein in drought-sensitive rice varieties, cultivars can be developed that, in addition to having the desired traits, will also be tolerant to drought stress.

KEYWORDS

Drought tolerance, InDels (insertions/deletions), Rice (*Oryza sativa*), SNPs (single-nucleotide polymorphisms)



«مقاله پژوهشی»

توالی یابی و آنالیز ژنوم رقم جهش یافته متحمل به تنش خشکی جهت شناسایی ژن‌های کاندید تحمل به خشکی در برنج

بنفشه فتاح^۱، عبدالرضا باقری^{۲*} , علی اکبر عبادی^۳، علیرضا سیفی^۴

چکیده

برنج یکی از محبوب‌ترین محصولات غذایی جهان است و تنش خشکی به عنوان مهم‌ترین چالش تولید آن، ضرورت توسعه ارقام متحمل به تنش خشکی را ایجاد می‌کند. تکنیک‌های توالی‌یابی نسل جدید از طریق شناسایی پلی‌مورفیسم در DNA، حتی در ارقام بسیار نزدیک، فرصت‌هایی را برای درک اساس ژنتیکی تفاوت‌های فنوتیپی مانند پاسخ به تنش‌های غیرزیستی فراهم می‌کنند. شناسایی SNPها و InDelها یکی از مهم‌ترین کاربردهای توالی‌یابی نسل جدید است. این تحقیق با هدف شناسایی ژن‌های کاندید تحمل به خشکی در لاین موتانت برنج متحمل به تنش خشکی با توالی‌یابی مجدد ژنوم برای این لاین و رقم مادری آن (هاشمی، که به خشکی حساس است)، انجام شد. در ژنوم این دو رقم تعداد ۷۳۰،۰۷۷ پلی‌مورفیسم شامل پلی‌مورفیسم تک نوکلئوتیدی (SNPs) و InDels شناسایی شد. تفرق واریانت‌های بزرگ اثر در جمعیت F₂ حاصل از تلاقی این دو رقم در لاین‌های حساس و متحمل به خشکی، بررسی شد. SNPهای شناسایی شده با مواردی که در مطالعات قبلی گزارش شده بودند اعتبار سنجی شدند. علاوه بر این، ارتباط عملکردی SNPها بر اساس حضور آنها در مناطق QTL و دومین‌های عملکردی حفاظت شده تجزیه و تحلیل شدند. این مطالعه یک ژن هدف امیدوارکننده برای تحمل به تنش خشکی معرفی می‌کند که می‌تواند منبع ارزشمندی در برنامه‌های به‌نژادی مولکولی برای تحمل به تنش خشکی برنج باشد.

واژه‌های کلیدی

تحمل به خشکی، SNP (پلی‌مورفیسم تک‌نوکلئوتیدی)، InDel (درج/حذف)

۱. دانشجوی دکتری، گروه بیوتکنولوژی و به‌نژادی گیاهی، دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.
۲. استاد، گروه بیوتکنولوژی و به‌نژادی گیاهی، دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.
۳. دانشیار، مؤسسه تحقیقات برنج کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، رشت، ایران.
۴. دانشیار، گروه بیوتکنولوژی و به‌نژادی گیاهی، دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.

نویسنده مسئول:

عبدالرضا باقری

رایانامه: bagheriyazd@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۱۰/۰۸

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۶/۲۵

استناد به این مقاله:

فتاح، بنفشه؛ باقری، عبدالرضا؛ عبادی، علی اکبر و سیفی، علیرضا (۱۴۰۴). توالی‌یابی و آنالیز ژنوم رقم جهش یافته متحمل به تنش خشکی جهت شناسایی ژن‌های کاندید تحمل به خشکی در برنج، فصلنامه علمی زیست فناوری گیاهان زراعی، ۱۵ (۱)، ۶۳-۷۸.
(DOI: [10.30473/cb.2025.73217.1996](https://doi.org/10.30473/cb.2025.73217.1996))

کارآمدتر از آب آبیاری، یکی از مهم‌ترین راهکارهای مقابله با بحران کمبود آب محسوب می‌شود. بنابراین شناسایی ژنوتیپ‌هایی که دارای کارایی مصرف آب بالاتری باشند، جهت بهره‌برداری در برنامه‌های آبی تولید ارقام متحمل برنج، بسیار مهم است و مطالعات عمیق در ژن‌های مرتبط با صفات مقاومت به تنش‌ها در برنج دارای اهمیت زیادی است (Woldegiorgis et al., 2019).

پیدایش فناوری نسل جدید توالی‌یابی (NGS)، ابزارهای لازم برای شناسایی شبکه‌های ژنی و ژن‌های کلیدی پاسخگو برای تنش خشکی را فراهم می‌کند. درک بهتر اساس ژنتیکی صفات ثانویه متحمل به خشکی و آنالیز تغییرات آلی در مکان ژنی مربوطه کمک شایانی به به‌نژادگران خواهد نمود. پژوهش حاضر با هدف شناسایی ژن‌های کاندید تحمل به خشکی در لاین موتانت برنج متحمل به تنش خشکی انجام شده است.

پیشینه پژوهش

توالی‌یابی ژنوم افق‌های جدیدی را پیش روی محققان قرار داده است. توالی‌یابی چند صد گونه به طور کامل، از جمله گیاهان مدل مهمی مانند برنج، تمرکز بسیاری از مطالعات علمی را به سمت آنالیزهای توالی‌یابی مجدد به منظور شناسایی و فهرست کردن تنوع ژنتیکی در افراد مختلف یک جمعیت تغییر داده است (Pagani et al., 2012). از تنوع شناسایی شده در افراد با فنوتیپ متفاوت می‌توان برای تشخیص رابطه بین فنوتیپ و ژنوتیپ استفاده کرد. شناسایی تعداد زیادی از چندریختی‌های توالی مانند پلی‌مورفیسم‌های تک نوکلئوتیدی (SNPs) و حذف و درج‌ها (Indels)، یکی از مهم‌ترین کاربردهای فناوری NGS است (Huang et al., 2013; Varshney et al., 2009). این چندریختی‌های ژنتیکی در میان توده‌های مختلف، تعیین کننده اصلی تفاوت‌های فنوتیپی هستند. پلی‌مورفیسم‌های تک نوکلئوتیدی به دلیل بالاتر بودن فراوانی در تعیین ساختار جمعیت و تجزیه و

مقدمه

برنج علاوه بر این که یکی از مهمترین محصولات غذایی جهان است، به عنوان یک گیاه مدل برای مطالعات مولکولی و ژنتیکی تک لپه‌ای‌ها شناخته شده است. چیزی که برنج را به یک سیستم بیولوژیکی جذاب تبدیل کرده است داشتن کوچک‌ترین اندازه ژنوم در بین غلات، در دسترس بودن نقشه ژنتیکی اشباع، سهولت در ترانسفورماسیون و وجود اطلاعات مولکولی و ژنتیکی گسترده آن است. توالی ژنوم برنج به طور کامل در دسترس است و تلاش‌های مستمری در جهت به‌روز کردن توالی‌ها و تفسیر داده‌ها بر مبنای پروژه‌های توالی‌یابی برنج و آنالیزهای مقایسه‌ای ژنوم برنج با گیاهان دیگر انجام شده است. علاوه بر این به دلیل داشتن طیف گسترده‌ای از تنوع مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی در برنج و اجداد وحشی آن، به عنوان یک سیستم مدل عالی برای مطالعه تکامل در گیاهان به شمار می‌رود. در عین برخورداری از مزایا ذکر شده، میزان تولید جهانی آن در شرایط کنونی رو به افزایش نیست و این مقدار بسیار پایین‌تر از تقاضای تعیین شده در سال ۲۰۵۰ است (Ray et al., 2013). صرف نظر از تعدادی عوامل زیستی و غیر زیستی که بطور منفی بر روی تولید برنج تأثیر می‌گذارند، آب یک محدودیت اصلی به خاطر کاهش سطح آب زیر زمینی و بارندگی غیر کافی در سطح جهانی است (Wada et al., 2010). از این رو، شناسایی پتانسیل تحمل کمبود آب در ژنوتیپ‌های برنج از نخستین اقدامات لازم برای مقابله با اثرات سوء کمبود آب در زراعت برنج می‌باشد. شناسایی ژنوتیپ‌های متحمل برای تولید ارقام زراعی متحمل به کمبود آب و دارای عملکرد بالا برای کشت در مناطق مواجه با تنش، خسارت کمبود آب را به حداقل رسانده و پایداری تولید برنج را تضمین خواهد کرد. همچنین شناسایی سازوکار تحمل تنش کمبود آب، امکان بهره‌برداری از صفات مرتبط با آن را در برنامه تولید ارقام متحمل تسهیل خواهد نمود. با توجه به محدودیت آب آبیاری برای اغلب گیاهان زراعی از جمله برنج، استفاده هر چه مفیدتر و

۱ Single Nucleotide Polymorphism

۲ Insertion-Deletion

محبوب با کیفیت دانه مطلوب بوده و دارای بیشترین سطح زیر کشت در بین ارقام محلی در استان‌های برنج‌خیز شمال کشور است. بذر لاین موتانت و مادری از مؤسسه تحقیقات برنج کشور تهیه شد. رقم هستی به عنوان یک لاین موتانت پیشرفته متحمل به تنش خشکی از طریق پرتوتابی ۳۰۰ گری پرتو گاما بر روی بذور برنج رقم بومی هاشمی و گزینش طی نسل‌های بعدی ایجاد شده است (Ebadi & Hallajian, 2024).

استخراج DNA و توالی‌یابی

DNA ژنومی دو رقم هاشمی و هستی از گیاهچه‌های ۱۵ روزه حاصل از تک بذر به روش CTAB تغییر یافته استخراج شد (Jain et al., 2013b). کمیت و کیفیت DNA استخراج شده به دو روش الکتروفورز روی ژل آگارز و اسپکتروفتومتری تعیین و تأیید شد و پس از آن برای توالی‌یابی به شرکت ماکروژن کره ارسال شد. توالی‌یابی کل ژنوم به صورت دوسویه^۱ به روش ایلومینا (TruSeq (Illumina Platform) و با عمق خوانش 100X انجام شد. فایل داده‌های توالی‌یابی کل ژنوم شامل دو فایل خوانش رفت^۲ و برگشت^۳ برای هر ژنوم با قالب fastq دریافت شد.

آنالیز داده‌های توالی‌یابی ژنوم

کنترل کیفیت داده‌های توالی‌یابی توسط برنامه FastQC تحت محیط لینوکس انجام شد. سپس با استفاده از نرم‌افزار Trimmomatic خوانش‌های دارای کیفیت پایین و همچنین خوانش‌های دارای توالی آداپتورها یا پرایمرها حذف شدند. برای هم‌ردیفی (Alignment) خوانش‌های فیلتر شده با ژنوم مرجع *Oryza sativa Japonica* نسخه IRGSP-1.0، از الگوریتم MEM در برنامه BWA^۴ استفاده شد (Jain et al., 2013a).

تحلیل‌های عدم تعادل لینکاژی دارای اهمیت قابل توجهی هستند و InDelها نیز در انتخاب به کمک نشانگر و نقشه برداری دقیق با موفقیت مورد استفاده قرار گرفته‌اند (Hayashi et al., 2006; Liang et al., 2011). اولین شناسایی SNPها روی پیش نویس ژنوم ارقام japonica و indica انجام شده است (Feltus et al., 2004). همچنین حدود ۱۶۰۰۰۰ SNP از طریق توالی‌یابی یک ناحیه ۱۰۰ Mb از ۲۰ رقم برنج در پروژه OryzaSNP شناسایی شد (McNally et al., 2009). توالی‌یابی مجدد ۶ لاین اینبرد برنج هندی موجب شناسایی حدود ۳ میلیون پلی‌مورفیسم در DNA شده است (Subbaiyan et al., 2012). شناسایی SNPها و InDelها در ارقام برنج ژاپنی توسط محققان دیگری نیز گزارش شده است (Arai-Kichise et al., 2011; Yamamoto et al., 2010). جین و همکاران با توالی‌یابی مجدد کل ژنوم سه رقم برنج با پاسخ‌های متفاوت به خشکی و شوری، با شناسایی ۵۴۸ SNP واقع در دومین‌های عملکردی حفاظت شده ۲۳۲ ژن، نشانگرهای عملکردی و ژن‌های کاندیدی برای تحمل به شوری و خشکی ارائه کرده‌اند (Jain et al., 2013a). اگر چه حجم بالایی از اطلاعات درباره پلی‌مورفیسم DNA در برنج در دسترس است، ولی توالی‌یابی مجدد ارقام بیشتری از برنج با ویژگی‌های زراعی مهم در شناسایی پلی‌مورفیسم هدف برای نقشه‌برداری ژن‌ها و آنالیز QTLها بخصوص برای صفات پیچیده‌ای مانند مقاومت به تنش خشکی می‌تواند راهگشا باشد.

روش‌شناسی پژوهش

مواد گیاهی

مواد گیاهی این آزمایش شامل رقم هستی یک لاین برنج (*Oryza sativa*) جهش یافته پیشرفته (M₈) متحمل به تنش خشکی و رقم بومی هاشمی حساس به تنش خشکی بوده است. همچنین ۱۲۰ ژنوتیپ از جمعیت در حال تفرق F₂ حاصل از تلاقی لاین هاشمی به عنوان پایه مادری و لاین موتانت به عنوان پایه پدری مورد مطالعه قرار گرفتند. برنج هاشمی از ارقام محلی معطر و

^۱ Paired-End

^۲ Forward read

^۳ Reverse read

^۴ Burrows-Wheeler Aligner

دیتابیس <http://qtaro.abr.affrc.go.jp/> دانلود شد و بر اساس موقعیت کروموزومی آن‌ها واریانت‌های واقع شده در محدوده QTL‌ها مورد بررسی قرار گرفتند. انوتیشن ژن‌هایی که در آن‌ها پلی‌مورفیسم رخ داده است در دیتابیس Ensembl و دیتابیس rapdb مورد بررسی قرار گرفت و به سایر داده‌های واریانت‌ها اضافه شد و در انتخاب ژن‌های کاندید لحاظ شد.

تأیید ژن‌های کاندید در جمعیت F₂

آزمایش مزرعه‌ای با هدف شناسایی تعدادی گیاه حساس و تعدادی گیاه مقاوم در جمعیت F₂ جهت تأیید ژن‌های کاندید، به طور خلاصه در چهار سال زراعی متوالی به ترتیب به صورت تلاقی دو رقم هستی و هاشمی، کاشت F₁، آزمایش گلدانی ژنوتیپ‌های نسل F₂ و آزمایش مزرعه‌ای فامیل‌های نسل F₃ اجرا شد.

در این تحقیق برای به دست آوردن جمعیت در حال تفرق نسل F₂، لاین حساس به تنش خشکی (هاشمی) به عنوان والد مادری و رقم هستی (لاین موتانت و مقاوم به تنش خشکی) به عنوان والد پدری مورد تلاقی قرار گرفتند. در سال دوم آزمایش بذره‌ای حاصل از تلاقی به عنوان نسل F₁ در کنار والدین در مزرعه کشت شدند.

ژنوتیپ‌های گیاهی مورد آزمون در سال سوم در شرایط گلدانی شامل رقم هستی و هاشمی (لاین موتانت و مادری) و افراد جمعیت F₂ حاصل از تلاقی این دو رقم بودند. در سال چهارم آزمایش جهت تأیید و گزینش مجدد افراد نسل F₂، تعداد ۳۰ ژنوتیپ حساس و ۳۰ ژنوتیپ متحمل شناسایی شده در آزمایش گلدانی، در کنار ارقام والدی در شرایط مزرعه‌ای مورد آزمون قرار گرفتند. ارزیابی فنوتیپی بر اساس سیستم ارزیابی استاندارد برنج IRRI انجام شد (IRRI, 2014).

با مشخص شدن SNP و InDel‌های تأثیرگذار در ژنوم رقم موتانت، ژن‌های کاندید شناسایی شدند. برای پلی‌مورفیسم‌های پیدا شده در گروهی از جمعیت F₂ شامل ۸ گیاه حساس و ۸ گیاه متحمل به تنش خشکی حاصل از بررسی‌های انجام شده در نتاج F₃، ژنوتایپینگ انجام شد تا نواحی ژنومی کاندید که با تحمل به خشکی

کاهش خطاهای حاصل از مرحله هم‌ردیفی، یک مرحله هم‌ردیفی مجدد (Realignment) با استفاده از نرم‌افزار GTAK^۱ انجام شد. به منظور تصحیح خطاهای توالی‌یابی و دیگر خطاهای مربوط به آزمایش، با استفاده از نرم‌افزار GATK نمره کیفیت بازها مجدداً کالیبره (recalibration) شد. کیفیت نقشه‌یابی با دو پارامتر درصد هم‌ردیفی خوانش‌ها با ژنوم مرجع و عمق پوشش از دستورهای flagstat و depth در نرم‌افزار Samtools محاسبه شد.

شناسایی و آنالیز SNP‌ها و InDel‌ها

واریانت‌ها شامل چند ریختی‌های تک نوکلئوتیدی و حذف و درج‌های کوچک ژنوم با استفاده از برنامه FreeBayes به دست آمد. خروجی این برنامه یک فایل VCF حاوی SNPs و InDels برای هر نمونه است. به منظور فیلتر کردن چند شکلی‌های تک نوکلئوتیدی و حذف و درج‌های کوچک، از ابزار Vcfilter در برنامه vcftools استفاده شد.

برای شناسایی واریانت‌های منحصر به نمونه موتانت (موجود در موتانت و غایب در نمونه هاشمی) از ابزار vcf-isec در برنامه vcftools استفاده شد. به منظور تفسیر، محاسبه شمارش هموزیگوس‌ها و هتروزیگوس‌ها در چند شکلی‌های تک نوکلئوتیدی و حذف و درج‌ها، همچنین شمارش جهش‌های جابجایی و معکوس در چند شکلی‌های تک نوکلئوتیدی، از برنامه snpEff استفاده شد (Cingolani et al., 2012). برای اعتبار سنجی SNP‌ها از گزارش‌های حاصل از مطالعات گذشته استفاده شد. برای این کار داده‌های SNP مربوط به *Oryza sativa* موجود در دیتابیس Ensembl دانلود و مورد استفاده قرار گرفت.

یکی از مهم‌ترین معیارهای انتخاب ژن‌های کاندید هم‌پوشانی با QTL‌های مرتبط با مقاومت به تنش خشکی است. برای شناسایی واریانت‌های موجود در محدوده این QTL‌ها در برنج لیست این QTL‌ها از

تفرق همزمان نشان می‌دهند شناسایی شود. ژنوتایپینگ از طریق توالی‌یابی سنگر انجام شد.

طراحی آغازگر برای ژنوتایپینگ

طراحی آغازگرها برای انجام ژنوتایپینگ در Primer3 (v. 0.4.0) انجام شد. آغازگرها به گونه‌ای طراحی شدند که موتاسیون مورد نظر در وسط قطعه تکثیری واقع شده باشد. برای اطمینان از صحت طراحی آغازگر بلاست (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) آن‌ها صورت گرفت. سنتر پرایمرها توسط شرکت سیناکلون انجام شد و آماده‌سازی آن‌ها طبق دستورالعمل ارائه شده توسط این شرکت صورت گرفت. جدول ۱ توالی و مشخصات پرایمرهای استفاده شده در این پژوهش را نشان می‌دهد.

با توجه به تک باند بودن محصولات PCR روی ژل الکتروفورز ۱/۵ درصد و غلظت مناسب تأیید شده با دستگاه اسپکتروفتومتر، ۲۵ مایکرولیتر از محصولات PCR به همراه پرایمرهای مربوطه برای توالی‌یابی سنگر به شرکت نیازن ارسال شد. قطعه تکثیر شده ابتدا در ژنوم مادری و موتانت توالی‌یابی شد و پس از هم‌ردیفی و تأیید وجود موتاسیون، محصولات PCR حاصل از تکثیر ژنوم ۸ گیاه حساس و ۸ گیاه مقاوم با پرایمر ژن‌های کاندید برای توالی‌یابی ارسال شدند.

یافته‌های پژوهش

هم‌ردیفی خوانش‌ها با ژنوم مرجع

داده‌های توالی‌یابی کل ژنوم هاشمی و موتانت شامل دو فایل خوانش رفت و برگشت برای هر ژنوم با پسوند fastQC به دست آمد. کنترل کیفیت داده‌ها با نرم‌افزار

FastQC کیفیت بالای توالی‌یابی را تأیید کرد. پس از حذف خوانش‌های دارای کیفیت پایین و همچنین خوانش‌های دارای توالی آدپتورها یا پرایمرها با استفاده از نرم‌افزار Trimmomatic، تعداد توالی‌ها در رقم هاشمی از ۲۰۸۷۱۲۲۴ به ۱۶۲۷۸۳۲۳ و در رقم موتانت از ۲۰۷۴۹۲۹۵ به ۱۷۹۱۰۸۳۵ رسید. پس از هم‌ردیفی خوانش‌ها با ژنوم مرجع *Oryza sativa Japonica* نسخه IRGSP-1.0 با استفاده از نرم‌افزار BWA، بیش از ۹۵ درصد خوانش‌ها در هر دو رقم با ژنوم مرجع هم‌ردیف شدند. درصد هم‌ردیفی و میانگین عمق خوانش برای هر رقم در جدول ۲ نشان داده شده است.

درصد بالای هم‌ردیفی داده‌ها با ژنوم مرجع نشان‌دهنده کیفیت مناسب داده‌های خام و دقت بالا در مراحل پیش‌پردازش و پالایش است. مطالعات مشابه در برنج نیز مقادیر هم‌ردیفی بالاتر از ۹۰ درصد را به‌عنوان شاخص استاندارد کیفیت داده‌ها گزارش کرده‌اند (Mahesh et al., 2020). بر اساس بررسی‌های کیم و همکاران، دستیابی به هم‌ردیفی با کیفیت بالا نه تنها احتمال بروز خطا در فرآیند فراخوانی واریانت‌ها را کاهش می‌دهد، بلکه موجب افزایش دقت در تعیین موقعیت جهش‌ها، به‌ویژه در نواحی تکراری ژنوم، می‌شود (Kim et al., 2022). همچنین به گفته وانگ و همکاران، میانگین عمق پوشش در محدوده ۵ تا ۱۰ برابر (X) برای مطالعات ژنومیک گیاهان، مقدار مناسبی جهت شناسایی واریانت‌های تک‌نوکلئوتیدی و حذف و اضافه‌های کوچک به شمار می‌رود (Wang et al., 2021). بر این اساس، کیفیت داده‌های حاصل در پژوهش حاضر برای انجام تحلیل‌های بعدی مناسب ارزیابی شد.

جدول ۱. توالی پرایمرهای استفاده شده برای ژنوتایپینگ

Table 1. Sequence of the primers used for genotyping

نام ژن	توالی پرایمر	دمای اتصال	طول قطعه تکثیری
Gene name	Primer sequences	Annealing Temperature	PCR product length
Os11g0493000	F: ATGGGTTTGTGTTTCAGAGC R: TTCAAAGCGCAATACGCTAC	58	462
Os11g0539500	F: ATCAAGTGCACCGTGATGGA R: TGACACGTAACCAACAGGTTTTG	58	447
Os08g0133700	F: TTGATTGCTCTTTCCTCTGC R: GATTTGACATGCATCGAACC	58	461

جدول ۲. خلاصه اطلاعات توالی‌یابی و آمار هم‌ردیفی ژنوم برنج

Table 2. Summary of sequence data and mapping statistics on the rice genome

Mutant	Hashemi	
20749295	20871224	تعداد کل توالی‌های کوتاه (Total reads)
17910835	16278323	تعداد خوانش‌های هم‌ردیف‌شده با ژنوم مرجع (Total reads mapped)
95.70%	97.73%	درصد هم‌ردیفی (Genome coverage (%))
5.61	5.64	میانگین عمق خوانش یا پوشش‌دهی (Sequencing depth)

شد که توزیع واریانت‌ها در درون کروموزوم‌ها نیز یکنواخت نیست. وقوع مناطق ژنومی با تفاوت معنی‌دار در تراکم پلی‌مورفیسیم‌های DNA پیش از این نیز در برنج و سایر گیاهان گزارش شده است (Arai-Kichise *et al.*, 2011; Caicedo *et al.*, 2007; Feltus *et al.*, 2004; Nordborg *et al.*, 2005; Subbaiyan *et al.*, 2012; Jain *et al.*, 2013a).

جدول ۴. نرخ واریانت‌ها در کروموزوم‌های ژنوم موتانت

Table 4. Variants rate details on the mutant genome chromosomes

Chromosome	Length	Variants	Variants rate
1	43,270,923	6,450	6,708
2	35,937,250	5,776	6,221
3	36,413,819	8,103	4,493
4	35,502,694	5,393	6,583
5	29,958,434	5,465	5,481
6	31,248,787	4,080	7,659
7	29,697,621	5,377	5,523
8	28,443,022	4,481	6,347
9	23,012,720	3,664	6,280
10	23,207,287	5,016	4,626
11	29,021,106	15,039	1,929
12	27,531,856	4,233	6,504
Total	373,245,519	73,077	5,107

بیشترین تراکم واریانت‌ها در کروموزوم ۱۱ احتمالاً ناشی از حضور خوشه‌ای از ژن‌های مرتبط با تنش‌های غیرزیستی و ژن‌های تنظیم‌کننده بیان در این کروموزوم است (Liu *et al.*, 2023). نواحی بالادست ژن‌ها معمولاً شامل عناصر تنظیمی هستند که می‌توانند به‌طور مستقیم بر میزان رونویسی و تنظیم بیان ژن‌ها تأثیر بگذارند؛ بنابراین تجمع واریانت‌ها در این نواحی ممکن است با تغییر در سطح بیان ژن‌های پاسخ‌دهنده به تنش خشکی مرتبط باشد (Zhao *et al.*, 2022). در مطالعه سینگ و همکاران نیز گزارش شده است که بخش قابل‌توجهی از QTL‌های مرتبط با تحمل به تنش خشکی در گیاه برنج در کروموزوم‌های ۸ و ۱۱ قرار دارند که این یافته با نتایج

شناسایی SNP ها و InDel ها

بعد از هم‌ردیفی با ژنوم مرجع و انجام فیلترینگ‌های پیش فرض برنامه BWA، واریانت‌های موجود در موتانت و ناموجود در رقم هاشمی استخراج شدند. در این مطالعه تعداد ۷۳،۰۷۷ چندریختی تک نوکلئوتیدی به دست آمد. بیشترین تعداد پلی‌مورفیسیم موجود در رقم موتانت از نوع SNP و پس از آن بیشترین واریانت‌ها به ترتیب از نوع MNP، DEL و INS می‌باشد. حدود ۱۸ درصد از SNP‌های شناسایی شده، در مطالعات پیشین گزارش شده بودند (McNally *et al.*, 2009). تعداد واریانت‌ها بر اساس نوع پلی‌مورفیسیم در جدول (۳) نشان داده شده است.

جدول ۳. تعداد واریانت‌ها بر اساس نوع واریانت

Type	Total
SNP	58,969
MNP	8,551
INS	1,898
DEL	2,268
MIXED	1,391
Total	73,077

توزیع SNP ها و InDel ها در ژنوم

تعداد SNP ها و InDel های شناسایی شده و فراوانی آن‌ها (تعداد در هر ۱۰۰ کیلو جفت باز) در بین کروموزوم‌ها متفاوت است. توزیع واریانت‌ها در کروموزوم‌های موتانت نسبت به هاشمی و نرخ واریانت در هر کروموزوم در جدول (۴) نشان داده شده است. بیشترین تعداد SNP و InDel در کروموزوم ۱۱ و کمترین تعداد در کروموزوم ۹ شناسایی شد. علاوه بر این مشاهده

۱ Multiple Nucleotide Polymorphism

۲ Deletion

۳ Insertion

حاشیه‌نویسی SNPها و InDelها

در این پژوهش از حاشیه‌نویسی ژنوم IRGSP-1.0 برای مشخص شدن تأثیر توزیع واریانت‌ها بر ویژگی‌های مختلف ژنومی استفاده کردیم. موقعیت SNPها و InDels در یک ژنوم می‌تواند بر بیان و عملکرد ژن تأثیر بگذارد. پلی‌مورفیسم‌های موجود در نواحی کدکننده دارای اهمیت ویژه‌ای هستند زیرا ممکن است عملکرد پروتئین را تغییر دهند. علاوه بر این، تغییرات موجود در توالی‌های تنظیمی نیز مهم هستند؛ به دلیل این که می‌توانند بیان ژن را تقویت یا سرکوب کنند و در نتیجه عملکرد ژن را تحت تأثیر قرار دهند. بنابراین، کشف پلی‌مورفیسم مرتبط با تغییرات عملکردی ژن‌ها دارای اهمیت زیادی است. مطالعات زیادی تأثیر بالای وقوع واریانت در نواحی تنظیمی بالادست و پایین دست در بیان ژن در حیوانات را نشان داده‌اند (Landry et al., 2007; Wittkopp et al., 2008; Wray, 2007). چند مطالعه در گیاهان نیز اهمیت چنین واریانت‌هایی را در تنظیم بیان ژن و تأثیر بر صفات زراعی گزارش کرده‌اند (Keurentjes et al., 2007).

نتایج مستندسازی چندریختی‌های تک نوکلئوتیدی نشان دادند که بیشترین واریانت‌ها در نواحی بالادست ژن‌ها رخ داده‌اند. پس از آن بیشترین واریانت‌ها به ترتیب در پایین دست و نواحی بین ژنی واقع شده‌اند. میزان آثار چندریختی‌های تک نوکلئوتیدی در شکل ۱ نشان داده شده است. از تعداد کل واریانت‌ها ۲۸/۱۱۳ درصد در نواحی پایین دست ۱/۷۹۹ درصد در نواحی اگزونی، ۲۴/۱۷۶ درصد در نواحی بین ژنی، ۳/۲۵ درصد در نواحی اینترونی، ۱۲/۱۳۵ درصد در نواحی ترنسکرپت، ۲۹/۰۲۶ درصد در نواحی بالادست، ۰/۸۸ درصد در نواحی 3'UTR و ۰/۵۲ درصد در نواحی 5'UTR قرار گرفته‌اند. در این مطالعه واریانت‌هایی که در ناحیه اگزون واقع شده‌اند از اهمیت ویژه‌ای برخوردارند.

پژوهش حاضر هم‌راستا است (Singh et al., 2021). به‌طور کلی، توزیع مکانی و تراکم واریانت‌ها می‌تواند نشانه‌های ژنومی ارزشمندی از جایگاه‌های مؤثر بر تحمل به خشکی در رقم موتانت ارائه دهد.

آنالیز SNPها و InDelها

در رقم موتانت بیشترین تعداد چند ریختی‌های تک نوکلئوتیدی از نوع جهش جایگزینی انتقالی^۱ (A/G و C/T) با ۵۲،۳۸۰ جهش بود و تعداد چندریختی‌های تک نوکلئوتیدی از نوع جهش جایگزینی متقاطع^۲ (A/C، A/T، G/C و G/T) ۲۲،۸۰۵ عدد بود. نسبت جهش انتقالی به متقاطع (Ts/Tv) در رقم موتانت ۲/۳ بود (جدول ۵). غلبه‌ی جهش‌های انتقالی یکی از پدیده‌های رایج در ژنوم گیاهان خودگشن مانند برنج است که این امر به پایداری بیشتر این نوع تغییرات در فرآیند همانندسازی DNA نسبت داده می‌شود (Li et al., 2022). نسبت به‌دست‌آمده‌ی جهش انتقالی به متقاطع (Ts/Tv ≈ 2.3) در این پژوهش، با مقادیر گزارش شده در مطالعات ژنوم کامل برنج توسط وانگ و همکاران (Wang et al., 2020) و هوانگ و همکاران (Huang et al., 2021) هم‌خوانی دارد. این نسبت معمولاً نشان‌دهنده‌ی کیفیت مطلوب داده‌های واریانت و صحت بالای هم‌ردیفی خوانش‌ها با ژنوم مرجع است (Kawakami et al., 2018). به‌طور کلی، نسبت بالاتر از دو بیانگر آن است که جهش‌های طبیعی‌تر و زیست‌پذیرتر در فرآیند پرتوتابی و انتخاب نسل‌های بعدی در رقم موتانت تثبیت شده‌اند (Li et al., 2022; Wang et al., 2020).

جدول ۵. تعداد و نسبت چند ریختی‌های تک نوکلئوتیدی بر

اساس نوع جهش جایگزینی

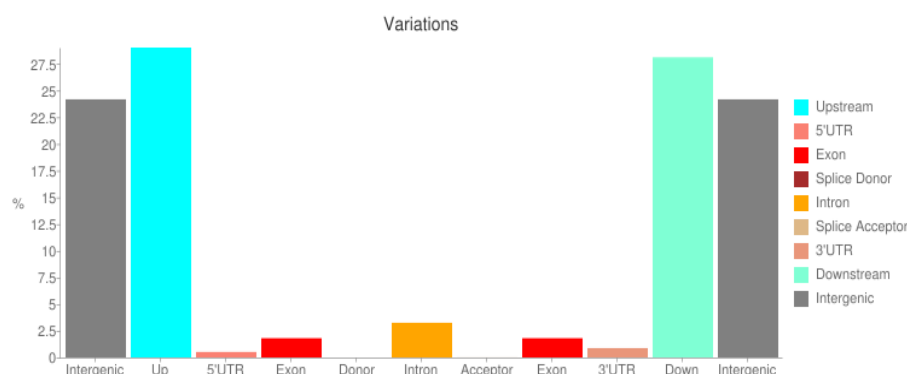
Table 5. Number and ratio of single nucleotide polymorphisms based on the type of substitution mutation

Transitions	52,380
Transversions	22,805
Ts/Tv ratio	2.2969

^۱ Transitions

^۲ Transversions

^۳ Transitions/ transversions



شکل ۱. درصد واریانت‌ها در نواحی مختلف ژنوم موتانت

Figure 1. Variant percentage in different regions of the mutant genome

ژن‌های کاندید و واریانت‌های موجود در محدوده QTL‌های تحمل به تنش خشکی

پس از بررسی و فیلتر کردن واریانت‌ها بر اساس آنچه ذکر شد، مطالعه کارکرد ژن‌ها و بررسی هم‌پوشانی با QTL‌های مرتبط با مقاومت به خشکی و در نظر گرفتن اسکور LOD^۱ هر QTL، مطالعه ارتولوگ ژن‌های دارای واریانت، مقایسه واریانت‌ها با دیتابیس واریانت‌های برنج، در نظر گرفتن تأثیر واریانت بر ژن و بر محصول آن و مطالعه ارتباط واریانت‌ها با صفات تحمل به خشکی، بررسی محل بیان ژن‌ها در گیاه و محصول بیان ژن، جستجوی عملکرد مولکولی ژن و فرایندهای بیولوژیکی که در آن‌ها دخیل است، در نهایت سه ژن برای مرحله ژنوتایپینگ کاندید شدند. در جدول (۶) نام ژن کاندید، نام ژن در سیستم LOC، شناسه SNP که در ژن رخ داده است و سایر مشخصات این ژن‌ها قید شده است.

نتایج حاصل از ژنوتایپینگ

نتیجه انجام توالی‌یابی قطعات حاصل از تکثیر ژنوم رقم موتانت و مادری با پرایمرهای سه ژن کاندید و هم‌ردیفی با توالی رفرنس، وجود موتاسیون مورد نظر در دو تا از سه ژن کاندید یعنی ژن Os11g0493000 (شکل ۲) و ژن Os08g0133700 (شکل ۴) را تأیید کرد.

چندریختی‌های تک نوکلئوتیدی هتروزیگوس و هموزیگوس

در ژنوم مورد مطالعه تعداد واریانت‌های هتروزیگوس ۴۶۶۰۸ عدد و هموزیگوس ۲۵۳۵۵ بود. در این مطالعه برای جستجوی ژن‌های کاندید مقاومت به خشکی واریانت‌های هموزیگوت را جدا شده و در آنالیزهای بعدی مورد استفاده قرار گرفتند. چون برنج خودگشن است و لاین موتانت مورد مطالعه چندین نسل خودگشن شده است انتظار می‌رود واریانت‌های واقعی هموزیگوت باشند. در گونه‌های خودگشن نظیر برنج، وقوع غالب واریانت‌های هموزیگوس امری طبیعی است، زیرا فرایند خودگشنی منجر به حذف تدریجی ال‌های ناهمسان و تثبیت ژنوتیپ‌ها می‌شود (Mansueto *et al.*, 2017). در مطالعات مشابه، نسبت واریانت‌های هموزیگوس در موتانت‌های پرتوده‌ی شده بین ۵۵ تا ۷۰ درصد گزارش شده است (Jain *et al.*, 2019; Furuta *et al.*, 2023). نسبت بالاتر هتروزیگوس‌ها در این مطالعه می‌تواند نتیجه‌ی جهش‌های جدید یا ساختارهای ژنومی پیچیده در مناطق خاصی از ژنوم باشد. از دیدگاه ژنتیکی، تمایز میان واریانت‌های هموزیگوس و هتروزیگوس برای شناسایی جهش‌های پایدار مرتبط با صفات پیچیده‌ای همچون تحمل به خشکی اهمیت زیادی دارد، زیرا تنها واریانت‌های تثبیت‌شده قابلیت انتقال پایدار به نسل‌های بعدی را دارند (Wang *et al.*, 2021).

^۱ Logarithm of the odds

جدول ۶. ژن‌های کاندید تحمل به خشکی و مشخصات آن‌ها

Table 6. Candidate genes for drought tolerance and their characteristics

Candidate genes	1	2	3
Gene name	Os11g0493000	Os11g0539500	Os08g0133700
LOC	LOC_Os11g30060.1	LOC_Os11g33300.1	LOC_Os08g04010.1
SNP ID	rs54404362	vcZ2HKGWT	10801921126
Expression	Shoots, flower, embryo, endosperm	expressed in all tissues	low expression, all tissues
Variant	frameshift (stop codon lost)	stop gained(Q→stop codon)	stop gained(S→stop codon)
Interesting	truncated protein turned to a complete protein	truncated protein	truncated protein
Gene Product Name	NBS-LRR type disease resistance protein Hom-B, putative, expressed	O-methyltransferase, putative, expressed	–Yaminoethanethiol dioxygenase, putative, expressed
Molecular function	protein binding	transferase activity, protein binding	catalytic activity
Biological process	response to stress	metabolic process, cellular process	metabolic process

HP1	TAGAATGAGCAAAGTGATTACTGGAAGTCGTTGTGTATGCCGATTTTGCCTCTACGCGT	161
MP1	TGGAATGAGCAAAGTGATTACTCGAAGTCGTTGTGTATGCCGATTTTGCCTCTACGCGT	197
Os11g0493000	TAGAATGAGCAAAGTGATTACTGGAAGTCGTTGTGTATGCCGATTTTGCCTCTACGCGT	900
MU	TGGAATGAGCAAAGTGATTACTCGAAGTCGTTGTGTATGCCGATTTTGCCTCTACGCGT	900
	* *****	
HP1	TGTGACATTATAGTAAC TACTCGGAGTGAGGCAGTGGCAAGGTTAGTTCAGACAATACCA	221
MP1	TGTGACATTATAGTAAC TACTCGGAGTGAGGCAGTGGCAAGGTTAGTTCAGACAATACCA	257
Os11g0493000	TGTGACATTATAGTAAC TACTCGGAGTGAGGCAGTGGCAAGGTTAGTTCAGACAATACCA	960
MU	TGTGACATTATAGTAAC TACTCGGAGTGAGGCAGTGGCAAGGTTAGTTCAGACAATACCA	960

HP1	TTCTACAATTAGACTACTTA-ATCCTGATGACAGCTGGTTGTTATTCAAGCAAACAGCG	280
MP1	TTCTACAATTAGACTACTTAATCCTGATGACAGCTGGTTGTTATTCAAGCAAACAGCG	317
Os11g0493000	TTCTACAATTAGACTACTTA-ATCCTGATGACAGCTGGTTGTTATTCAAGCAAACAGCG	1019
MU	TTCTACAATTAGACTACTTAATCCTGATGACAGCTGGTTGTTATTCAAGCAAACAGCG	1020

شکل ۲. HP1: توالی حاصل از تکثیر ژنوم هاشمی با پرایمرهای ژن کاندید ۱ (Os11g0493000)، MP1: توالی حاصل از تکثیر ژنوم موتانت

با پرایمر ژن کاندید ۱، Os11g0493000: توالی ژن رفرنس، MU: توالی ژن موتانت مورد انتظار

Figure 2. HP1: The sequence obtained from the amplification of the Hashemi genome with primers of candidate gene

1, MP1: The sequence obtained from the amplification of the Mutant genome with primers of candidate gene 1,

Os11g0493000: Reference gene sequence, MU: Expected mutant gene sequence

Os11g0539500	ATGTTCCAATCCATTCCACCAGCGGACGCTGTTCTACTCAAAGTACGTATCACATAGGCA	1440
MU	ATGTTCTAATCCATTCCACCAGCGGACGCTGTTCTACTCAAAGTACGTATCACATAGGCA	1440
HP2	ATGTTCTAATCCATTCCACCAGCGGACGCTGTTCTACTCAAAGTACGTATCACATAGGCA	120
MP2	ATGTTCTAANCCNTTCNACCAGCGGACGCTGTTCTACTCAAAGTACGTATCACATAGGCA	126

شکل ۳. HP2: توالی حاصل از تکثیر ژنوم هاشمی با پرایمرهای ژن کاندید ۲ (Os11g0539500)، MP2: توالی حاصل از تکثیر ژنوم موتانت

با پرایمر ژن کاندید ۲، Os11g0539500: توالی ژن رفرنس، MU: توالی موتانت مورد انتظار

Figure 3. HP2: The sequence obtained from the amplification of the Hashemi genome with primers of candidate gene

2, MP2: The sequence obtained from the amplification of the Mutant genome with primers of candidate gene 2,

Os11g0539500: Reference gene sequence, MU: Expected mutant gene sequence

HP3	ATTGNAATATTCTGCTTACCAACATCGGCGGNTATTCTCTCCATGATCATCCGGNAATG	402
Os08g0133700	ATTGGAATATTCTGCTTACCAACGTCGGCGGTCAATCTCTCCATGATCATCCGGGAATG	1428
MU	ATTGGAATATTCTGCTTACCAACGTAGGCGGTCAATCTCTCCATGATCATCCGGGAATG	1428
MP3	ATTGNAATATTCTGCTTACCAACGNANGCGNCATCTCTCCATGATCATCCGGNAATG	390

شکل ۴. HP3: توالی حاصل از تکثیر ژنوم هاشمی با پرایمرهای ژن کاندید ۳ (Os08g0133700)، MP3: توالی حاصل از تکثیر ژنوم موتانت

با پرایمر ژن کاندید ۳، Os08g0133700: توالی ژن رفرنس، MU: توالی موتانت مورد انتظار

Figure 4. HP3: The sequence obtained from the amplification of the Hashemi genome with primers of candidate gene

3, MP3: The sequence obtained from the amplification of the Mutant genome with primers of candidate gene3,

Os08g0133700: Reference gene sequence, MU: Expected mutant gene sequence

مولکولی^۱ اتصال به پروتئین است و در فرایند بیولوژیکی^۲ پاسخ به استرس نقش دارد. نام محصول این ژن پروتئین مقاومت به بیماری NBS-LRR^۳ گزارش شده. در مطالعات محل بیان این ژن در ساقه، گل، جنین و آندوسپرم ذکر شده است. این ژن دارای یک رونوشت^۴ است.

در توالی ژن موتانت سه واریانت مشاهده شد. واریانت اول از نوع SNP است و با تبدیل نوکلئوتید A به G باعث حذف استاپ کدون قبل از orf رمز کننده پپتید شده است. واریانت دوم نیز SNP و با تبدیل G به C باعث تبدیل اسید آمینه قطبی تریتوفان (w) به اسید آمینه قطبی سرین (s) شده است؛ و واریانت سوم از نوع اینترشن بوده و اضافه شدن یک نوکلئوتید A و تغییر توالی TAATC به TAAATC باعث تغییر فریم شیفت و از دست رفتن یک استاپ کدون شده است. این واریانت در دیتابیس واریانت‌های برنج با شناسه rs54404362 ثبت شده است. بنا بر آنچه ذکر شد پیش‌بینی می‌شود ژن موتانت با حذف دو استاپ کدون، یک پروتئین کامل با پپتیدی به طول ۸۳۴ اسید آمینه تولید کند (شکل ۵). نتیجه هم‌ردیفی توالی پپتیدی ژن موتانت مشابهت بسیار بالایی با توالی پپتید RPP13-Like protein1 (*Oryza glaberrima*)^۵ نشان داد (شکل ۶). RPP13 به عنوان پروتئین‌های مقاومتی گزارش شده است که در مکانیسم‌های دفاعی گیاهان مختلف نقش دارد (Sakariya et al. 2024, Villet et al., 2015). RPP13 یک شبه پروتئین دخیل در مقاومت به بیماری و حاوی دومین NB-ARC است. بسیاری از پروتئین‌های موثر در مقاومت، دارای یک دومین مرکزی NB-ARC هستند. این پروتئین نقش مهمی در مقاومت به بیماری‌های مختلف گیاهی از جمله

بررسی ژن‌های کاندید تحت تنش خشکی

نتیجه انجام توالی‌یابی قطعات حاصل از انجام PCR ژنوم ۸ لاین حساس و ۸ لاین مقاوم F2- حاصل از ارزیابی‌های فنوتیپی بر اساس سیستم ارزیابی استاندارد برنج IRRI - با پرایمرهای دو ژن کاندید نهایی، تنها در ژن Os11g0493000 تفاوت واریانت مشهودی در لاین‌های حساس و مقاوم مشاهده شد (جدول ۷).

جدول ۷. مقایسه نقاط دارای موتاسیون در توالی تکثیر شده

لاین‌های حساس (S1 تا S8) و لاین‌های مقاوم (T1 تا T8) با پرایمرهای ژن کاندید ۱ (با سه موتاسیون) و ژن کاندید ۲ در کنار توالی رقم موتانت و هاشمی و توالی ژن رفرنس

Table 7. Comparison of mutation sites in the amplified sequences of sensitive lines (S1 to S8) and resistant lines (T1 to T8) using primers for Candidate Gene 1 (with three mutations) and Candidate Gene 2, alongside the sequences of the mutant Variety, Hashemi variety, and the reference gene sequence

	Os11g0493000(1)	Os11g0493000(2)	Os11g0493000(3)	Os08g0133700
Reference	A	G	A-A	G
Hashemi	A	G	A-A	G
Mutant	G	C	AAA	C
T1	G	C	AAA	N
T2	G	C	AAA	C
T3	G	C	AAA	G
T4	A	G	A-A	C
T5	G	C	AAA	G
T6	G	C	AAA	G
T7	A	G	A-A	N
T8	G	C	AAA	C
S1	A	G	A-A	G
S2	A	G	A-A	G
S3	A	G	A-A	C
S4	A	G	A-A	C
S5	G	C	AAA	C
S6	A	G	A-A	C
S7	A	G	A-A	N
S8	G	C	AAA	N

ژن Os11g0493000 (LOC_Os11g30060.1)

ژن Os11g0493000 روی کروموزوم ۱۱ قرار دارد و طول ژن ۴۹۹ نوکلئوتید است. این ژن پروتئینی به طول ۷۰ اسید آمینه را رمز کرده است. ساختار این ژن از یک اگزون و دو اینترون تشکیل شده است.

بررسی انوتیشن ژن در در دیتابیس‌های Ensembl و rapdb نشان می‌دهد که این ژن دارای عملکرد

^۱ Molecular function

^۲ Biological process

^۳ Nucleotide-binding site and leucine-rich repeat

^۴ Transcript

^۵ Recognition of *Peronospora Parasitica* 13-like

سفیدک پودری دارد (Cheng *et al.*, 2018; Bittner- (Eddy *et al.*, 2000).

Hashemi gene:TTGGATAATGTTTGAATGAGCAAAGTGATTACTCGAAGTCGTT.....AGACTACTTAATCCTGATGA
CAGCTGGTTGTTATTCAAGCAAACAGCG TTTGTTGAGCATGATAATGTCAGTCCAGCAAACCTAGTA.....
Hashemi peptid:L D N V Stop N E Q S D Y W K S..... D Y L I L Met T A G C Y S S K Q R L L S Met I Met S V Q Q T Stop
Mutant gene:TTGGATGATGTTTGAATGAGCAAAGTGATTACTCGAAGTCGTT..... AGACTACTTAATCCTGATGA
CAGCTGGTTGTTATTCAAGCAAACAGCG TTTGTTGAGCATGATAATGTCAGTCCAGCAAACCTAGTA.....
Mutant peptid:L D D V W N E Q S D Y S K S D Y L N P D D S W L L F K Q T A F V E H D N V S P A N L V.....

شکل ۵. مقایسه توالی ژن کاندید Os11g0493000 و پیش بینی پپتید آن در ژنوم هاشمی و موتانت

Figure 5. Comparison of Os11g0493000 Candidate genes sequence and its peptid prediction in Hashemi and Mutant genome

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

MUTANT	MMTLEGSRIIGGCM SVLAIVGMGGLGKTTLAQLVYNDPKVRQAFDLFGWVCVSEHFDVNNI	60
RPP13-like	MMTLEGSRIIGGCM SVLAIVGMGGLGKTTLAQLVYNDPKVRQAFDLFGWVCVSEHFDVNNI	60
MUTANT	TRKILSSIARKNC DYIQSSELQGGLENLIKDKRVFLVLDVWNEQSDYKSLCMPIFAST	120
RPP13-like	TRKILSSIARKNC DYIQSSELQGGLENLIKDKRVFLVLDVWNEQSDYKSLCMPIFAST	120
MUTANT	RCDIIVTTRSEAVARLVQITIPFYNLDYLNPDOSWLLFKQTAFVEHDNVSPANLVEIGQRI	180
RPP13-like	RCDIIVTTRSEAVARLVQITIPFYNLDYLNPDOSWLLFKQTAFVEHDNVSPANLVEIGQRI	180
MUTANT	AKKCQGLPLALKTLGSLVRFETNMKWRDVLQSELWDLERSQNEVLPAL ELSYKHMPMHL	240
RPP13-like	AKKCQGLPLALKTLGSLVRFETNMKWRDVLQSELWDLERSQNEVLPAL ELSYKHMPMHL	240
MUTANT	KLCFVSLSLYLKDTYFDESIVVWLKSLHLLQCDGTONSNEIGGLYFTQLVQRSLIQQVD	300
RPP13-like	KLCFVSLSLYKDTYFDESIVVWLKSLHLLQCDGTONSNEIGGLYFTQLVQRSLIQQVD	300
MUTANT	THGRMAIHDLVHDLACFLAGEEFFRLEEDGYVEIPKGARCM SIMPHQCKRSTQISNASQ	360
RPP13-like	THGRMAIHDLVHDLACFLAGEEFFRLEEDGYVEIPKGARYMSIMPHQCKRSTQISNASQ	360
MUTANT	SLRVII LIRINIKNPEALFMNCKKFQIIQVIDDSFANVLLDFMGDMKLLRHFR LIRSCN	420
RPP13-like	SLRVII LIRININPEALFMNCKKFRIIQVIDDSFANVLLDFMGDMKLLRHFR LIRSCN	420
MUTANT	EVKLVISDSMSQQFNLTNCEAYS LHIGIRLANQLNPIHLWKCGCYLREL RMNKIR	480
RPP13-like	EVKLVISDSMSQQFNLTNCEAYS LHIGIRLANQLNPIHLWKCGCYLREL RMNKIR	480
MUTANT	RLHIYGLCNVSSIQDVNEAHLHKKDLEILELDFESGGICKVHKEEADV NQAISTVSGGS	540
RPP13-like	RLHIYGLCNVSSIQDVNEAHLHKKDLEILELDFESGGICKVHKEEADV NQAISTVSGGS	540
MUTANT	ILES LRPHHQSLKVL RMKNLNEVNYP SWLGSASF SKLTKLRLENCQSQH LPTLGELPSLK	600
RPP13-like	ILES LRPHHQSLKVL RMKNLNEVNYP SWLGSASF SKLTKLRLENCQSQH LPTLGELPSLK	600
MUTANT	SIDIRQMEYVENIGRVFCSLDPSVKGFRSLAHLRFQDMNRFSEWSEVHDGEFSSLETLLI	660
RPP13-like	SIDIRQMEYVENIGRVFCSLDPSVKGFRSLAHLRFQDMNRFSEWSEVHDGEFSSLETLLI	660
MUTANT	WSASELSSLPVFPSSLR SFELCDCKNLVTFPASATLQILSISSECKLKELPALPSLRSL	720
RPP13-like	WSASELSSLPVFPSSLR SFELCDCKNLVTFPASATLQILSISSECKLKELPALPSLRSL	720
MUTANT	KLSGCESLVAVGHPFSLTVLHMSTEFEEVLHKL MNHLKLEELSISSDTMKLINLEPHS	780
RPP13-like	KLSGCESLVAVGHPFSLTVLHMSTEFEEVLHKL MNHLKLEELSISSDTMKLINLEPHS	780
MUTANT	LP LLRELELVCPNLQNC DALASLSLEILCVNRCSQLRVPNSLQSLEKLYSP	834
RPP13-like	LP LLRELELVCPNLQNC DALASLSLKILCVNRCSQLRVPNSLQSLEKLYSP	834

شکل ۶. هم‌ردیفی توالی پپتیدی ژن کاندید Os11g0493000 در لاین موتانت با توالی پپتید RPP13-Like protein1 (*Oryza glaberrima*)

Figure 6. Alignment of the peptide sequence of the candidate gene Os11g0493000 in the mutant line with the peptide sequence of RPP13-Like Protein1 (*Oryza glaberrima*)

پرولین و بسته‌شدن روزنه‌ها در گیاه، تحمل به خشکی را در رقم موتانت افزایش داده‌اند.

نتیجه‌گیری و پیشنهادها

ژنوم موتانت حاوی پلی مورفیسم در ژن RPP13-Like Os11g0493000، توالی پروتئینی مشابه protein1(*oryza glaberrima*) را رمز می‌کند. به نظر می‌رسد شبه پروتئین RPP13 علاوه بر تأثیر در مقاومت به تنش‌های زیستی، در تنش‌های غیر زیستی نیز نقش دارد. امید است بتوان با القاء موتاسیون هدفمند یا استفاده از تکنیک‌های ویرایش ژنوم با هدف تولید این پروتئین در ارقام برنج حساس به تنش خشکی، به ارقامی دست یافت که علاوه بر داشتن خصوصیات مطلوب مورد نظر، متحمل به تنش خشکی نیز باشند. با توجه به شناسایی و طراحی پرایمر برای ژن مذکور در رقم موتانت هستی، می‌توان این ژن را به ارقام تجاری حساس به تنش خشکی با استفاده از تکنیک انتخاب به کمک نشانگر منتقل کرد.

تشکر و قدردانی

این پژوهش با حمایت مادی و معنوی گروه بیوتکنولوژی دانشگاه فردوسی مشهد انجام شده است. قسمت مولکولی پژوهش در آزمایشگاه بخش ژنومیکس پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی منطقه شمال کشور و قسمت مزرعه‌ای در فارم موسسه تحقیقات برنج کشور در رشت انجام شده است. سپاسگزار پشتیبانی و حمایت استادان و بزرگوارانی هستیم که در پیشبرد این پروژه همکاری و همراهی داشته‌اند و قطعاً بدون حضور آنان انجام این پژوهش ممکن نبود.

تعارض منافع

هیچ‌گونه تعارض منافع توسط نویسندگان وجود ندارد.

پروتئین‌های NBS-LRR با درک مولکول‌های سیگنال‌دهنده‌ی تنش (مانند ROS و ABA) و فعال‌سازی مسیرهای دفاعی از جمله MAPK cascade، نقش مهمی در القای تحمل به تنش ایفا می‌کنند (Li et al., 2023). در گیاهان برنج، افزایش بیان ژن‌های NBS-LRR در شرایط خشکی موجب تنظیم اسمزی از طریق کنترل تجمع پروتئین‌های حفاظت‌کننده از سلول مانند LEA، دیرین‌ها (Dehydrins) و پرولین می‌شود (Fang et al., 2022). به علاوه، ارتباط این ژن با مسیر هورمون آبسزیک اسید (ABA) نیز قابل توجه است. مطالعات جونگ و همکاران و همچنین کومار و همکاران نشان داده‌اند که برخی از اعضای خانواده NBS-LRR از طریق تعامل با فاکتورهای رونویسی WRKY و DREB2A، موجب افزایش بیان ژن‌های مرتبط با بستن روزنه‌ها، حفظ پتانسیل آبی سلول و کاهش تبخیر می‌شوند. بنابراین، تغییرات ایجادشده در این ژن احتمالاً منجر به القای پاسخ‌های سریع‌تر دفاعی در برابر تنش خشکی شده است (Kumar et al., 2022; Jung et al., 2020).

هم‌چنین، شباهت پپتیدی بالای ژن موتانت با RPP13-like protein در گونه *Oryza glaberrima* که نقش آن در مقاومت به سفیدک پودری شناخته شده است، نشان می‌دهد که سازوکارهای مشترکی میان پاسخ به تنش‌های زیستی و غیرزیستی وجود دارد. این موضوع با مدل “cross-talk” در سیگنال‌دهی دفاعی هم‌خوان است، جایی که فعال‌سازی یک مسیر مقاومت به تنش زیستی می‌تواند موجب افزایش تحمل به تنش خشکی نیز شود (Bertioli et al., 2022; Seo et al., 2022). در مجموع، جهش‌های شناسایی‌شده در Os11g0493000 احتمالاً باعث افزایش پایداری، بیان یا فعالیت پروتئین NBS-LRR شده‌اند که در نتیجه با تقویت مسیرهای سیگنال‌دهی دفاعی، افزایش محتوای

References

Arai-Kichise, Y., Shiwa, Y., Nagasaki, H., Ebana, K., Yoshikawa, H., Yano, M., & Wakasa, K.

(2011). Discovery of genome-wide DNA polymorphisms in a landrace cultivar of

- Japonica* rice by whole-genome sequencing. *Plant Cell Physiol*, 52, 274–282. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcr003>.
- Bertioli, D. J., Jenkins, J., Stasolla, C., & Wang, X. (2022). NBS-LRR gene family expansion and diversification in plants, evolutionary and functional perspectives. *Frontiers in Plant Science*, 13, 847211. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.847211>
- Bittner-Eddy, P. D., Crute, I. R., Holub, E. B., & Beynon, J. L. (2000). RPP13 is a simple locus in *Arabidopsis thaliana* for alleles that specify downy mildew resistance to different avirulence determinants in *Peronospora parasitica*. *Plant*, 21(2), 177–88. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.2000.00664.x>.
- Caicedo, A. L., Williamson, S. H., Hernandez, R. D., Boyko, A., Fledel-Alon, A., York, T. L., Polato, N. R., Olsen, K., M., Nielsen, R., McCouch, S. R., Bustamante, C. D., & Purugganan, M. D. (2007) Genome-wide patterns of nucleotide polymorphism in domesticated rice. *PLoS Genetics*, 3, 1745–1756. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.0030163>.
- Cheng, J., Fan, H., Li, L., Hu, B., Liu, H., & Liu, Z. (2018). Genome-wide Identification and Expression Analyses of RPP13-like Genes in Barley. *BioChip*, 12, 102–113. <https://doi.org/10.1007/s13206-017-2203-y>.
- Cingolani, P., Platts, A., Wang, L. L., Coon, M., Nguyen, T., Wang, L., & Ruden, D. M. (2012). A program for annotating and predicting the effects of single nucleotide polymorphisms, snpeff, SNPs in the genome of *Drosophila melanogaster* strain w1118; iso-2; iso-3. *Fly*, 6(2), 80–92. <https://doi.org/10.4161/fly.19695>.
- Ebadi, A. A., & Hallajian, M. T. (2024). Release of a new rice cultivar, Hasti, derived from Hashemi landrace The final project report with registration number 65362, Rice Research Institute of Iran-Rasht. (in persian)
- Fang, Y., Liao, K., Du, H., Xu, Y., Song, H., Li, X., Xiong, L., & Zhao, Y. (2022). NBS-LRR-mediated drought tolerance and osmotic adjustment in rice. *Plant Science*, 320, 111297. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2022.111297>
- Feltus, F. A., Wan, J., Schulze, S. R., Estill, J. C., Jiang, N., & Paterson, A. H. (2004). An SNP resource for rice genetics and breeding based on subspecies *indica* and *japonica* genome alignments. *Genome Research*, 14, 1812–1819. <https://doi.org/10.1101/gr.2479404>.
- Furuta, T., Uehara, K., & Kobayashi, N. (2023). Mutation spectra induced by gamma irradiation in rice genomes revealed by whole-genome resequencing. *Frontiers in Plant Science*, 14, 1170389. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1170389>
- Hayashi, K., Yoshida, H., & Ashikawa, I. (2006). Development of PCR-based allele-specific and InDel marker sets for nine rice blast resistance genes. *Theoretical and Applied Genetics*, 113, 251–260. <https://doi.org/10.1007/s00122-006-0290-6>
- Huang, X., Lu, T., & Han, B. (2013). Resequencing rice genomes, an emerging new era of rice genomics. *Trends in Genetics*, 29, 225–232. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2012.12.001>.
- Huang, X., Zhao, Y., & Li, J. (2021). Patterns of transition and transversion polymorphisms in the rice genome. *The Plant Genome*, 14(3), e20149. <https://doi.org/10.1002/tpg2.20149>
- IRRI (International Rice Research Institute). (2006). Direct seeded rice, a low cost establishment technology. IRRI Rice factsheet. Available at http://www.narc.org.np/rice_knowledge_bank/fact.
- IRRI (International Rice Research Institute). (2014). Standard Evaluation System for Rice (SES). Los Banos, Laguna, Philippines.
- Jain, R., Sharma, R., & Singh, N. (2019). Analysis of homozygous and heterozygous SNPs in gamma-irradiated rice mutants using next-generation sequencing. *Plant Physiology Reports*, 24(4), 612–621. <https://doi.org/10.1007/s40502-019-00489-7>
- Jain, S. A., Jesus, F., Marchioro, G., & Araújo, E. (2013b). Extraction of DNA from honey and its amplification by PCR for botanical identification. *Food Science and Technology*, 33, 753–756. <https://doi.org/10.1590/S0101-20612013000400022>.
- Jain, K., Moharana, K. C., Shankar, R., Kumari, R., & arg, R. (2013a). Genomewide discovery of DNA polymorphisms in ricecultivars with contrasting drought and salinity stress response and their functional relevance. *Plant Biotechnology*, 12, 253–264. <https://doi.org/10.1111/pbi.12133>.
- Jung, H., Kim, J., Lee, S., Park, H., Choi, Y., & Seo, P. J. (2020). Genome-wide identification of NBS-LRR genes in rice and their roles in drought stress tolerance. *BMC Plant Biology*, 20(1), 434. <https://doi.org/10.1186/s12870-020-02621-0>
- Kawakami, K., Matsuda, K., & Nagano, A. J. (2018). Transition/transversion ratio as an indicator of sequencing error and variant calling quality in plants. *DNA Research*, 25(5), 515–523. <https://doi.org/10.1093/dnares/dsy024>
- Keurentjes, J. J., Fu, J., Terpstra, I. R., Garcia, J. M., van den Ackerveken, G., Snoek, L. B., Peeters, A. J., Vreugdenhil, D., Koornneef, M., & Jansen, R. C. (2007). Regulatory network construction in *Arabidopsis* by using

- genome-wide gene expression quantitative trait loci. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 104, 1708–1713. <https://doi.org/10.1073/pnas.0610429104>.
- Kim, H. J., Lee, Y. S., & Kim, S. H. (2022). Optimization of read alignment strategies for high-quality variant calling in rice genome resequencing. *Rice*, 15(1), 43. <https://doi.org/10.1186/s12284-022-00597-9>
- Kumar, A., Singh, R., Verma, P., Gupta, S., Sharma, N., & Tiwari, V. (2022). ABA-dependent regulation of NBS-LRR genes under drought stress in rice. *Plant Molecular Biology*, 110(3), 221–236. <https://doi.org/10.1007/s11103-022-01222-7>
- Landry, C. R., Lemos, B., Rifkin, S. A., Dickinson, W. J., & Hartl, D. L. (2007). Genetic properties influencing the evolvability of gene expression. *Science*, 317, 118–121. <https://doi.org/10.1126/science.1140247>.
- Liang, F., Xin, X., Hu, Z., Xu, J., Wei, G., Qian, X., Yang, J., He, H., & Luo, X. (2011). Genetic analysis and fine mapping of a novel semidominant dwarfing gene LB4D in rice. *Integrative Plant Biology*, 53, 312–323. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7909.2011.01031.x>.
- Mahesh, H. B., Shirke, M. D., & Gowda, M. (2020). Genome alignment and SNP identification in rice genotypes differing in drought tolerance. *Scientific Reports*, 10(1), 11242. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-68045-0>
- Mansueto, L., Fuentes, R. R., & Leung, H. (2017). SNP discovery and genotyping in rice for genetic diversity and trait association studies. *Plant Biotechnology Journal*, 15(9), 1176–1186. <https://doi.org/10.1111/pbi.12712>
- McNally, K. L., Childs, K. L., Bohnert, R., Davidson, R. M., Zhao, K., Ulat, V. J., Zeller, G., Clark, R. M., Hoen, D. R., Bureau, T. E., Stokowski, R., Ballinger, D. G., Frazer, K. A., Cox, D. R., Padhukasahasram, B., Bustamante, C. D., Weigel, D., Mackill, D. J., Bruskiewich, R. M., Ratsch, G., Buell, C. R., Leung, H., & Leach, J. E. (2009). Genomewide SNP variation reveals relationships among landraces and modern varieties of rice. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 106, 12273–12278. <https://doi.org/10.1073/pnas.0900992106>.
- Nordborg, M., Hu, T. T., Ishino, Y., Jhaveri, J., Toomajian, C., Zheng, H., Bakker, E., Calabrese, P., Gladstone, J., Goyal, R., Jakobsson, M., Kim, S., Morozov, Y., Padhukasahasram, B., Plagnol, V., Rosenberg, N. A., Shah, C., Wall, J. D., Wang, J., Zhao, K., Kalbfleisch, T., Schulz, V., Kreitman, M., & Bergelson, J. (2005). The pattern of polymorphism in *Arabidopsis thaliana*. *Biology*, 3, e196. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0030196>.
- Pagani, I., Liolios, K., Jansson, J., Chen, I. A., Smirnova, T., & Nosrat, B. (2012). The Genomes OnLine Database (GOLD) v.4, status of genomic and metagenomic projects and their associated metadata. *Nucleic Acids Research*, 40, 571–579. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr1100>.
- Ray, D. K., Mueller, N. D., West, P. C. & Foley, J. A. (2013). Yield trends are insufficient to double total crop production by 2050. *PLoS ONE*, 8(6), 66428. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0066428>.
- Sakariya, P., Sakure, A. A., Kumar, S., Rojasara, Y., & Vaja, M. B. (2024). Identification of candidate genes through comparative proteomics profiling under root knot nematode infection in *Nicotiana tabacum* L. *South African Journal of Botany*, 169, 155–163. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2024.04.014>
- Seo, E., Kim, J. H., Park, H., Lee, S., & Choi, D. (2022). Expanding roles of NBS-LRR genes in plant abiotic stress responses. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(4), 1892. <https://doi.org/10.3390/ijms23041892>
- Singh, S., Kumar, R., & Pathak, D. (2021). Mapping QTLs and identifying SNP hotspots for drought tolerance in rice. *Frontiers in Genetics*, 12, 671583. <https://doi.org/10.3389/fgene.2021.671583>
- Subbaiyan, G. K., Waters, D. L., Katiyar, S. K., Sadananda, A. R., Vaddadi, S., & Henry, R. J. (2012). Genome-wide DNA polymorphisms in elite indica rice inbreds discovered by whole-genome sequencing. *Plant Biotechnology*, 10, 623–634. <https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2011.00676.x>.
- Thumma, B. R., Matheson, B. A., Zhang, D., Meeske, C., Meder, R., Downes, G. M., & Southerton, S. G. (2009). Identification of a Cis-acting regulatory polymorphism in a Eucalypt COBRA-like gene affecting cellulose content. *Genetics*, 183, 1153–1164. <https://doi.org/10.1534/genetics.109.106591>.
- Varshney, R. K., Nayak, S. N., May, G. D., & Jackson, S. A. (2009). Next-generation sequencing technologies and their implications for crop genetics and breeding. *Trends in Biotechnology*, 27, 522–530. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2009.05.006>.
- Villeth, G. R., Carmo, L. S., Silva, L. P., Fontes, W., Grynberg, P., Saraiva, M., Brasileiro, A. C., Carneiro, R. M., Oliveira, J. T., Grossi-de-sa, M. F., & Mehta, A. (2015). Cow pea *Meloidogyne*

- incognita interaction, root proteomic analysis during early stages of nematode infection. *Proteomics*, 15(10), 1746–1759. <https://doi.org/10.1002/pmic.201400561>.
- Wada, Y., Van Beek, L. P. H., Van Kempen, C. M., Reckman, J. W. T. M., Vasak, S., Bierkens, M. F. P. (2010). Global depletion of ground water resources. *Geophysical Research Letters*, 37, 20. <https://doi.org/10.1029/2010GL044571>.
- Li, C., Zhang, Y., & Zhao, L. (2022). Genome-wide analysis of single nucleotide polymorphisms in rice cultivars under abiotic stress. *Frontiers in Genetics*, 13, 868345. <https://doi.org/10.3389/fgene.2022.868345>.
- Liu, H., Zhang, X., & Yuan, J. (2023). Genomic distribution and functional annotation of SNPs in rice cultivars differing in drought tolerance. *BMC Genomics*, 24(1), 512. <https://doi.org/10.1186/s12864-023-09752-9>.
- Wang, D., Zhang, X., & Xu, Y. (2020). Whole-genome resequencing analysis of rice accessions reveals insights into genetic variations and SNP characteristics. *BMC Genomics*, 21(1), 823. <https://doi.org/10.1186/s12864-020-07235-6>.
- Wang, X., Chen, J., & Liu, S. (2021). Evaluation of sequencing depth and coverage for accurate SNP detection in rice genome resequencing. *Plant Methods*, 17(1), 122. <https://doi.org/10.1186/s13007-021-00779-5>.
- Wittkopp, P. J., Haerum, B. K., & Clark, A. G. (2008). Regulatory changes underlying expression differences within and between *Drosophila* species. *Nature Genetics*, 40, 346–350. <https://doi.org/10.1038/ng.77>.
- Woldegiorgis S. T., Wang, S. He, Y., Xu, Z., Chen, L., Tao, H., Zhang, Y., Zou, Y., Harrison, A., Zhang, L., Ai, Y., Liu, W., & He, H. (2019). Rice Stress-Resistant SNP Database. *Springer Open*, 12, 97. <https://doi.org/10.1186/s12284-019-0356-0>.
- Wray, G. A. (2007). The evolutionary significance of cis-regulatory mutations. *Nature Reviews Genetics*, 8, 206–216. <https://doi.org/doi,10.1038/nrg2063>.
- Yamamoto, T., Nagasaki, H., Yonemaru, J., Ebana, K., Nakajima, M., Shibaya, T., & Yano, M. (2010). Fine definition of the pedigree haplotypes of closely related rice cultivars by means of genome-wide discovery of single-nucleotide polymorphisms. *BMC Genomics*, 11, 267. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-11-267>.
- Zhang, X., Cal, A. J., & Borevitz, J. O. (2011). Genetic architecture of regulatory variation in *Arabidopsis thaliana*. *Genome Research*, 21, 725–733. <https://doi.org/10.1101/gr.115337.110>.
- Zhao, H., Yu, D., & Zhang, H. (2022). Functional impacts of SNPs in promoter regions of drought-responsive genes in rice. *Frontiers in Plant Science*, 13, 976511. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.976511>.

From Myths to Science: A Scientific Approach for Addressing Concerns of Genetically Modified Products in Simple Terms

Mohammad Kazem Momeni* 

Department of Genetics, Faculty of Basic Sciences, Shahrekord University, Shahrekord, Iran.

Correspondence:
Mohammad Kazem Momeni
Email: mk.momeny@sku.ac.ir

Received: 10, Feb. 2025
Accepted: 10, Jun. 2025

How to cite:

Momeni, M.K. (2025). From Myths to Science: A Scientific Approach for Addressing Concerns of Genetically Modified Products in Simple Terms. *Crop Biotechnology*, 15 (1), 79-100
(DOI: [10.30473/cb.2025.73758.2003](https://doi.org/10.30473/cb.2025.73758.2003))

ABSTRACT

Food security continues to pose significant challenges globally, with population growth, climate variability, and environmental constraints placing unprecedented pressure on agricultural systems. Scientific evidence demonstrates that genetically modified (GM) crops offer viable solutions to these challenges through enhanced productivity traits, including improved yield potential, abiotic stress tolerance, and reduced agrochemical inputs. Meta-analyses of field trial data consistently show yield advantages of 6–30% for major GM crops compared to conventional varieties, alongside significant reductions in pesticide use. Despite these documented benefits, public acceptance of GM technology remains hindered by persistent misinformation. Systematic reviews of safety research, encompassing thousands of studies, have found no credible evidence of adverse health effects associated with approved GM crops. Regulatory agencies worldwide, including the EFSA, FDA, and Codex Alimentarius, employ rigorous, science-based evaluation protocols that consistently confirm the safety of commercially available GM varieties. This analysis examines the disconnect between scientific consensus and public perception through three key dimensions: empirical performance data from two decades of commercial cultivation, a comparative analysis of international regulatory approaches, and a critical evaluation of prevalent misinformation narratives. The findings underscore the importance of evidence-based discourse in agricultural policy formulation, particularly as climate change intensifies production challenges. Effective science communication emerges as a crucial factor in realizing the potential of agricultural biotechnology to contribute to sustainable food security objectives while maintaining rigorous safety standards. The weight of scientific evidence supports the conclusion that responsible deployment of GM crops represents a valuable tool for addressing contemporary agricultural challenges within appropriate regulatory frameworks.

KEYWORDS

Genetically Modified Organisms (GMOs), Food Security, Food security, Transgenic risks, Social concerns.



«مقاله مروری»

ترا ریخته؛ از هیاهو تا واقعیت: بررسی علمی نگرانی‌های اجتماعی پیرامون محصولات ترا ریخته به زبان ساده

محمد کاظم مؤمنی * 

گروه ژنتیک، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شهرکرد،
شهرکرد، ایران.

نویسنده مسئول:

محمد کاظم مؤمنی

رایانامه: mk.momeny@sku.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۱۱/۲۲

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۳/۲۰

استناد به این مقاله:

مؤمنی، محمد کاظم (۱۴۰۴). ترا ریخته؛ از هیاهو تا واقعیت: بررسی علمی نگرانی‌های اجتماعی پیرامون محصولات ترا ریخته به زبان ساده، فصلنامه علمی زیست فناوری گیاهان زراعی، ۱۵ (۱)، ۷۹-۱۰۰.

(DOI: [10.30473/cb.2025.73758.2003](https://doi.org/10.30473/cb.2025.73758.2003))

چکیده

تأمین غذا یکی از مهم‌ترین چالش‌هایی است که بشر امروز با آن مواجه است. محصولات ترا ریخته یا محصولات حاصل از ارگانیسم‌های اصلاح شده ژنتیکی (GMOs) به عنوان یک راه حل ضروری و اجتناب ناپذیر برای مقابله با مشکلات جهانی برای تأمین غذا نظیر افزایش جمعیت، محدودیت منابع طبیعی، تغییرات اقلیمی، کمبود منابع آبی، آلودگی‌های محیط زیستی و کاهش زمین‌های کشاورزی مطرح شده‌اند. این محصولات با تغییرات ژنتیکی که توسط انسان در آن‌ها ایجاد شده است، ویژگی‌هایی کسب کرده‌اند که به آن‌ها امکان می‌دهد در برابر شرایط نامطلوب مقاوم‌تر باشند، بهره‌وری کشاورزی را افزایش دهند و کیفیت غذایی را بهبود بخشند. با این حال، محصولات ترا ریخته موضوع شایعات و تئوری‌های توطئه بسیاری قرار گرفته‌اند. برخی از این ادعاها، مانند کنترل صهیونیست‌ها بر فناوری ترا ریخته، وجود تراشه‌های الکترونیکی در محصولات ترا ریخته‌ای نظیر واکسن‌ها و تأثیرات منفی آن‌ها بر گرایش جنسی انسان، به طور گسترده در فضای رسانه‌ای و اجتماعی منتشر شده‌اند. این مقاله به بررسی علمی این شبهات پرداخته و با استناد به مطالعات علمی، پاسخ‌های روشنی به این نگرانی‌ها ارائه می‌دهد. همچنین تحلیل قوانین و مقررات مربوط به محصولات ترا ریخته در کشورهای مختلف در این مقاله گنجانده شده است تا تفاوت‌ها و شباهت‌های رویکردهای قانونی بررسی شود. هدف نهایی، برطرف کردن تصورات رایج و افزایش امکان تصمیم‌گیری آگاهانه در مورد مصرف محصولات ترا ریخته است.

واژه‌های کلیدی

ارگانیسم‌های اصلاح شده ژنتیکی (GMOs)، امنیت غذایی، خطرات ترا ریخته، نگرانی‌های اجتماعی.

مقدمه

با پیشرفت بیوتکنولوژی مدرن، به‌ویژه در زمینه مهندسی ژنتیک، امکان انتقال ژن‌های خاص از یک موجود زنده به موجود دیگر از طریق فرآیندی به نام تراریختگی فراهم شده است. این محصولات به‌عنوان محصولات تغییر یافته ژنتیکی (GM)، جانداران اصلاح‌شده ژنتیکی (GMO, genetically modified organism) و محصولات دست‌کاری شده ژنتیکی (GE, genetically engineered) شناخته می‌شوند. علاوه بر این، ارگانیسم‌های تراریخته که قابلیت تکثیر دارند، مانند دانه‌ها و موجودات زنده، به‌عنوان ارگانیسم‌های زنده اصلاح‌شده (LMOs, living modified organisms) معرفی می‌شوند. مهندسی ژنتیک پتانسیل زیادی برای تولید سریع‌تر ارقام گیاهی و محصولات بهبود یافته از نظر کیفیت و صفات عملکردی نسبت به روش‌های اصلاح سنتی داراست (Viljoen, Dajee, & Botha, 2006).

در نسل اول محصولات تراریخته، عمدتاً مزایای زراعی برای کشاورزان در نظر گرفته شده بود، اما این محصولات هیچ سود مستقیمی برای مصرف‌کنندگان نداشتند. با این حال، طی توسعه نسل دوم و سوم محصولات تراریخته علاوه بر مزایای زراعی، خواص بهداشتی و تغذیه‌ای می‌تواند به سود مصرف‌کنندگان باشد. به‌طور خاص، نسل سوم این محصولات با هدف تولید مواد مغذی و دارویی طراحی شده‌اند (Smyth, Khachatourians, & Phillips, 2002). از جمله دستاوردهای این فناوری می‌توان به تولید گیاهان مقاوم به آفات، داروهای نو ترکیب، محصولات صنعتی حاصل از میکروارگانیسم‌های تراریخته و فرآورده‌های غذایی مشتق شده از موجودات زنده تراریخته اشاره کرد. این محصولات باعث افزایش کمی و کیفی تولیدات صنایع مرتبط شده‌اند ((WHO, 2014b)).

در سال‌های اخیر، محصولات تراریخته پیشرفته با موفقیت به مرحله کشت تجاری رسیده‌اند. ذرت طلایی غنی‌شده با ویتامین A در برزیل، هند و فیلیپین (P. Kumar, Kumar, Dhiman, & Srivastava, 2022) و سویای حاوی امگا-۳ در برزیل ۳۴ میلیون هکتار، (۲۰۲۳) (Shelke, Chambhare, Nikalje, &)

(Nikam, 2023) پنبه Bt در هند (۱۳ میلیون هکتار، ۲۰۱۹) (Nagaraj et al., 2024) از نمونه‌های موفق کشت تجاری نسل جدید این فناوری هستند. همچنین یک‌گونه برنج تراریخته مقاوم به ویروس در حال توسعه است و پیش‌بینی می‌شود به‌زودی به تولید انبوه برسد (Sharma, Ghosh, Kar, & Ghosh, 2025). این دستاوردها نشان‌دهنده تأثیر عمیق این فناوری بر کشاورزی و سلامت هستند.

با این حال، نگرانی‌هایی در مورد خطرات احتمالی این محصولات بر سلامت انسان و محیط‌زیست وجود دارد که موجب شده است سازمان‌های بین‌المللی و کشورهای مختلف، قوانین و مقررات خاصی را برای استفاده ایمن از این فناوری‌ها وضع کنند. سازمان جهانی بهداشت (WHO) ارگانیسم‌های اصلاح‌شده ژنتیکی را به‌عنوان گیاهان، حیوانات یا میکروارگانیسم‌هایی تعریف می‌کند که در آن‌ها ماده ژنتیکی (DNA) به‌گونه‌ای تغییر یافته است که این تغییرات به‌طور طبیعی از طریق جفت‌گیری یا نوترکیبی طبیعی رخ نمی‌دهد ((WHO, 2014b)).

تکنیک‌های اصلاح نباتات باهدف بهبود شیوه‌های کشاورزی و ارتقای کیفیت تغذیه توسعه یافته‌اند تا محصولاتی با ویژگی‌های مطلوب مانند تحمل به علف‌کش، مقاومت به حشرات و مقاومت به تنش‌های غیر زیستی تولید کنند (James, 2014). سرمایه‌گذاری در محصولات بیوتکنولوژی نه تنها پتانسیل افزایش عرضه مواد غذایی را دارد بلکه می‌تواند تأثیرات مثبتی بر تغذیه، طعم، قیمت و کاهش ضایعات مواد غذایی داشته باشد. در حقیقت، عدم استفاده از فناوری GMO در کشاورزی می‌تواند به کاهش عملکرد، افزایش آسیب‌های زیست‌محیطی و افزایش قیمت مواد غذایی منجر شود که پیامدهای منفی برای رفاه اقتصاد جهانی خواهد داشت ((Taheripour, Mahaffey, & Tyner, 2016)).

محصولات تراریخته بین سال‌های ۱۹۹۶ تا ۲۰۱۴ میلادی تأثیرات چشمگیری بر کشاورزی جهانی داشته‌اند. این فناوری در طول این ۱۹ سال حدود ۱۵۰ میلیارد دلار به درآمد کشاورزان در سراسر جهان افزوده است. از نظر افزایش تولید، این فناوری منجر به تولید

تحلیل یافته‌ها و بحث

در سال‌های اخیر، بحث‌ها و نگرانی‌های بسیاری پیرامون مصرف محصولات تراریخته در میان مردم و جوامع علمی شکل گرفته است. این نگرانی‌ها عمدتاً به دلایل مختلفی از جمله اطلاعات نادرست، عدم آگاهی کافی در مورد فرآیند تولید محصولات تراریخته و انتشار تئوری‌های توطئه پیرامون اثرات این محصولات بر سلامت انسان و محیط‌زیست ایجاد شده‌اند. بسیاری از افراد به دلیل ابهامات و گسترش شایعات و اطلاعات غلط درباره فناوری محصولات تراریخته، با تردید به مصرف این محصولات نگاه می‌کنند. این نگرانی‌ها که اغلب بر پایه اطلاعات فاقد مبنای علمی، تئوری‌های توطئه و فرضیات نادرست شکل گرفته‌اند، باعث شده است مردم تصور کنند ممکن است این محصولات تأثیرات منفی بلندمدتی بر سلامت داشته باشند. در این بخش، تلاش می‌شود تا این ادعاها به زبان ساده و با استناد به شواهد علمی موردبررسی و ارزیابی قرار گیرند تا بتوان تصویری روشن‌تر از تأثیرات این محصولات بر سلامت انسان و محیط‌زیست ارائه داد.

لزوم استفاده از محصولات تراریخته

در دنیای امروز، رشد سریع جمعیت و محدودیت‌های منابع طبیعی باعث شده است که تأمین غذای کافی برای همگان به یکی از چالش‌های اساسی بشر تبدیل شود. این افزایش جمعیت، به‌ویژه در کشورهای در حال توسعه، فشار زیادی بر سیستم‌های تولید غذایی وارد کرده است. در ایران با جمعیتی بیش از ۸۵ میلیون نفر و محدودیت‌های جدی در منابع آبی، به‌ویژه در مناطق خشک و نیمه‌خشک، تأمین غذا و حفظ تولیدات کشاورزی به یک چالش اساسی تبدیل شده است. خشک‌سالی‌های متوالی، کاهش منابع آب زیرزمینی و بهره‌برداری ناپایدار از زمین‌های کشاورزی، باعث کاهش بازدهی محصولات و تهدید امنیت غذایی کشور شده است (Mokhtari Hoshi & Moradi, 2021; Rezayan Ahad & Rezayan, 2016). بحران آب و کشاورزی به‌وضوح در مواردی مانند خشک شدن دریاچه

۳۲۲ میلیون تن ذرت، ۱۵۸ میلیون تن سویا و ۳۲ میلیون تن پنبه بیشتر در سطح جهانی شده است. جالب‌توجه اینکه حدود ۶۵ درصد از مزایای اقتصادی ناشی از افزایش عملکرد و تولید بیشتر بوده و ۳۵ درصد باقیمانده از طریق کاهش هزینه‌های تولید، به‌ویژه در بخش سموم و آفت‌کش‌ها حاصل شده است. این فناوری همچنین با امکان کشت دوم محصول در یک سال، به‌ویژه در سیستم کشت گندم-سویا در آمریکای جنوبی، تحول عظیمی در بهره‌وری کشاورزی ایجاد کرده است (Brookes & Barfoot, 2016).

تأثیرات جهانی این فناوری چشمگیر بوده است. گسترش کشت تراریخته قیمت جهانی ذرت و سویا را کاهش داده، درحالی‌که ممنوعیت آن در اروپا موجب ۲۰٪ افزایش هزینه تولیدات دامی شده است (Henseler et al., 2013; Van Eenennaam, 2013). همچنین، برنج طلایی در فیلیپین سالانه جان هزاران نفر را نجات داده و همچنین ده‌ها میلیون دلار در هزینه‌های درمانی صرفه‌جویی ایجاد نموده است (Zimmermann & Qaim, 2004).

باوجود توسعه و پذیرش گسترده محصولات تراریخته در کشاورزی و صنایع غذایی، نگرانی عمومی و بحث‌های علمی در مورد اثرات مضر بالقوه آن‌ها همچنان رایج است. بسیاری از متون موجود، اغلب بسیار فنی و غیرقابل‌دسترس برای عموم است که منجر به سردرگمی و شک و تردید شده است. یک شکاف جدی بین جامعه علمی و توده‌های مردم به‌واسطه فقدان بررسی‌های جامع علمی که خطرات و مزایای بالقوه محصولات تراریخته را به شیوه‌ای ساده که توسط افراد غیرمتخصص به‌راحتی قابل‌درک باشد، وجود دارد. هدف این مقاله پیش رو، پر کردن این شکاف با بررسی انتقادی شواهد موجود در مورد مضر بودن مصرف محصولات تراریخته، باهدف ارائه متنی متعادل، واضح و قابل‌دسترس از یافته‌های علمی برای مخاطبان در عموم طبقات مردم است.

طراحی شده‌اند که در مناطق خشک و نیمه‌خشک کاربرد فراوانی دارند (Agarwal, Shukla, Gupta, & Jha, 2013; Sun, Hu, Shen, & Zhang, 2013). سوبا، ذرت، گندم و برنج مقاوم به خشکی که در برخی مناطق نیمه‌خشک جهان مورد استفاده قرار گرفته، توانسته است در شرایط کمبود آب، بهره‌وری کشاورزی را حفظ کند (Tirado & Cotter, 2010). این امر در مناطقی که به دلیل شرایط اقلیمی نامساعد یا محدودیت‌های منابع آبی، تولیدات کشاورزی کمتر است، از اهمیت بیشتری برخوردار است.

به‌علاوه، کاهش مساحت اراضی قابل کشت به دلیل تغییرات کاربری زمین و توسعه شهرنشینی، نیاز به افزایش بهره‌وری از اراضی موجود را افزایش داده است. به‌عنوان مثال در ایران، توسعه سریع شهرها و مناطق صنعتی به‌ویژه در اطراف کلان‌شهرهایی مانند تهران، اهواز و مشهد، منجر به تبدیل زمین‌های کشاورزی به مناطق مسکونی و صنعتی شده است. در دشت ورامین که یکی از مناطق مهم کشاورزی در نزدیکی تهران است، بخش قابل توجهی از زمین‌های حاصلخیز به دلیل گسترش شهرنشینی و ساخت‌وساز از بین رفته‌اند (Alinejad, Afifi, & Mowgli, 2023; Jalalian, Hamid, Pashazade Asghar, & Farivash, 2016; Javanshiri Mehdi, Anabastani Ali Akbar, & Hamdollah, 2020; Sajadian Nahid & Jafar, 2020). همچنین، در استان‌های شمالی مانند گیلان و مازندران، ساخت ویلاها و اماکن تفریحی بر روی زمین‌های کشاورزی، مساحت اراضی قابل کشت را کاهش داده است (Khooshebast, Parandeh, & Hoshyar, 2014; Shoghi, Molaee Hashjin, & Rezaei, 2023). محصولات تراریخته با بازدهی بالاتر می‌توانند به بهره‌وری بیشتر از اراضی محدود کمک کنند.

بزرگنمایی خطرات احتمالی

بزرگنمایی خطرات احتمالی محصولات تراریخته یکی از موانع اصلی پذیرش عمومی این فناوری است. درحالی‌که مطالعات علمی بسیاری نشان داده‌اند که محصولات تراریخته ایمن بوده و می‌توانند به افزایش بهره‌وری

ارومیه، بحران تالاب گاوخونی، کاهش جریان رودخانه‌های کارون و کرخه در خوزستان و خشک‌سالی‌های متوالی در سیستان و بلوچستان دیده می‌شود. در چنین شرایطی، روش‌های سنتی کشاورزی به‌تنهایی قادر به پاسخگویی به نیازهای غذایی جهانی نیستند. به همین دلیل، توجه به فناوری‌های جدید مانند تولید محصولات تراریخته به‌عنوان یک راهکار ضروری مطرح شده است (Gebretsadik & Kiflu, 2018; Qaim & Kouser, 2013).

بسیاری از محصولات تراریخته از طریق اصلاحات ژنتیکی قادر به مقاومت در برابر آفات و بیماری‌ها شده‌اند که در نتیجه، کاهش مصرف سموم شیمیایی و افزایش تولید محصول را به همراه دارد. یکی از دلایل اصلی مراجعه به محصولات تراریخته، همین توانایی این محصولات در افزایش بهره‌وری تولیدات کشاورزی است (Kavhiza et al., 2022; K. Kumar et al., 2020). به‌عنوان مثال، ذرت تراریخته که به‌گونه‌ای مهندسی شده تا در برابر آفات مقاوم باشد، به کشاورزان در سراسر جهان کمک کرده است تا بدون نیاز به استفاده گسترده از سموم دفع آفات، محصول بیشتری تولید کنند (Tabashnik & Gould, 2012). برنج طلایی، نوع دیگری از محصول تراریخته است که با غنی‌سازی ویتامین A به بهبود کیفیت تغذیه‌ای و مبارزه با سوءتغذیه در برخی از کشورهای درحال توسعه کمک کرده است (Amna et al., 2020). پنبه تراریخته نیز یکی از موفق‌ترین نمونه‌ها در هند است که با کاهش خسارت آفات، به‌طور چشمگیری بهره‌وری کشاورزان را افزایش داده و مصرف سموم شیمیایی را کاهش داده است (Krishna & Qaim, 2012).

همچنین، با تغییرات اقلیمی و کمبود منابع آبی، کشاورزی سنتی به‌طور فزاینده‌ای با مشکلات مواجه شده است. محصولات تراریخته می‌توانند در برابر شرایط محیطی سخت‌تر مقاومت کنند و حتی در خاک‌های ضعیف یا تحت شرایط کم‌آبی بازدهی مطلوبی داشته باشند. به‌عنوان مثال، برخی از محصولات تراریخته برای مقاومت در برابر خشک‌سالی یا تحمل به شوری بالا

کشاورزی و کاهش نیاز به سموم شیمیایی کمک کنند، برخی گروه‌ها به دلایل مختلف علمی، یا برخی نگاه‌های غیرعلمی از جمله تئوری‌های توطئه یا منافع اقتصادی، خطرات احتمالی این محصولات را بزرگنمایی می‌کنند. فناوری تراریخته‌ها، مانند بسیاری از فناوری‌های پیشرفته دیگر، با مزایا و چالش‌های خاص خود همراه است. این فناوری توانسته است تحولاتی چشمگیر در زمینه تولید غذا ایجاد کند، اما مانند هر فناوری نوینی، با نگرانی‌ها و خطراتی نیز روبرو است که باید به‌دقت موردبررسی قرار گیرند (Rani & Usha, 2013). مثلاً، گوشی‌های هوشمند و شبکه‌های وای فای که به زندگی روزمره ما سرعت و راحتی بخشیده‌اند، نگرانی‌هایی در مورد حریم خصوصی و اثرات احتمالی امواج بر سلامتی دارند. خودروهای برقی نیز با کاهش آلودگی هوا به محیط‌زیست کمک می‌کنند، اما مسائل مربوط به بازیافت باتری‌ها و استخراج مواد معدنی را مطرح می‌کنند. فناوری‌های مرتبط با هوش مصنوعی و رباتیک نیز درحالی‌که باعث پیشرفت‌هایی در خودکارسازی و بهره‌وری شده‌اند، اما بحث‌هایی پیرامون جایگزینی نیروی کار انسانی و امنیت داده‌ها ایجاد کرده‌اند. تراریخته‌ها نیز، در کنار مزایایی چون افزایش بهره‌وری کشاورزی و کاهش مصرف سموم، با نگرانی‌هایی مثل اثرات طولانی‌مدت بر سلامت انسان و محیط‌زیست روبرو هستند.

یکی از قیاس‌های مناسبی که در این زمینه می‌توان مطرح کرد، مقایسه خطرات و مزایای انرژی هسته‌ای است. انرژی هسته‌ای نیز مانند فناوری تراریخته‌ها، باهدف حل مشکلات بزرگ بشری، یعنی تأمین انرژی پایدار و کاهش وابستگی به سوخت‌های فسیلی، توسعه یافت؛ اما باوجود مزایای آن، نگرانی‌های زیادی در مورد خطرات احتمالی این فناوری، از جمله حوادث هسته‌ای و مدیریت پسماندهای رادیواکتیو، وجود دارد. به‌عنوان مثال، حادثه چرنوبیل در سال ۱۹۸۶ در اوکراین یکی از بزرگ‌ترین فاجعه‌های هسته‌ای در تاریخ بود که نشت مواد رادیواکتیو به مناطق وسیعی آسیب رساند و باعث تخلیه و آلودگی شدید مناطق مسکونی شد. همچنین، فاجعه فوکوشیما در ژاپن در سال ۲۰۱۱ که بر اثر زلزله و سونامی رخ داد، منجر به نشت مواد رادیواکتیو به

محیط‌زیست و اقیانوس‌ها شد. علاوه بر حوادث، مدیریت پسماندهای رادیواکتیو نیز از دیگر نگرانی‌های مهم است. برای مثال، ذخیره‌سازی پسماندهای هسته‌ای در پایگاه یوکا ماتین در ایالات متحده همواره موضوع بحث و نگرانی بوده است، زیرا این پسماندها برای هزاران سال فعال باقی می‌مانند و خطرات طولانی‌مدتی برای محیط‌زیست و سلامت انسان دارند. باوجود نگرانی‌های موجود در مورد خطرات احتمالی فناوری هسته‌ای، از جمله حوادث نشت رادیواکتیو و مدیریت پسماندهای هسته‌ای، تقاضای جهانی برای دستیابی به این فناوری به‌طور مداوم در حال افزایش است. به‌عنوان مثال، بحران هسته‌ای ایران نمونه‌ای از این تقاضای جهانی است. ایران باهدف دستیابی به فناوری هسته‌ای برای تولید انرژی و سایر کاربردهای آن، به توسعه برنامه‌های هسته‌ای خود پرداخته است و حتی تحریم‌های شدیدی را برای این منبع انرژی مخاطره‌آمیز تحمل کرده است. در نتیجه و بر اساس موارد ذکرشده، فناوری تراریخته‌ها نیز باوجود پتانسیل بالای آن برای افزایش تولید غذا و مقابله با چالش‌های کشاورزی، با نگرانی‌هایی از جمله اثرات زیست‌محیطی و سلامت انسان مواجه است.

وضعیت محصولات تراریخته در کشورهای مختلف از نظر واردات و کاشت

از میان ۱۹۶ کشور جهان، تعداد محدودی (حدود ۳۰ کشور) تا سال ۲۰۲۴ به کشت محصولات تراریخته مبادرت کرده‌اند (ISAAA, 2024)، که نشان‌دهنده وجود انحصار و سطح بالای این فناوری است. از این تعداد محدود، ۱۹ کشور به‌عنوان «کشورهای مگا» شناخته می‌شوند که هر یک سطحی معادل یا بیشتر از ۵۰ هزار هکتار را به کشت این محصولات اختصاص داده‌اند. این امر نشان‌دهنده اهمیت بالای این کشورها در پذیرش و تولید محصولات تراریخته در مقیاس بزرگ است (Mathur, Javid, Kulshrestha, Mandal, & Reddy, 2017; Rozas, Kessi-Pérez, & Martínez, 2022). در حال حاضر، پنج کشور عمده تولیدکننده محصولات تراریخته شامل آمریکا، برزیل،

مجاز	مجاز	ژاپن
مجاز	غیرمجاز	کره جنوبی
مجاز	غیرمجاز	تایلند
مجاز	مجاز	میانمار
مجاز	مجاز	ویتنام
مجاز	مجاز	بنگلادش
مجاز	مجاز	فیلیپین
مجاز	غیرمجاز	نپال
مجاز	غیرمجاز	آذربایجان
مجاز	غیرمجاز	فلسطین اشغالی
غیرمجاز	غیرمجاز	الجزایر
غیرمجاز	غیرمجاز	بوتان
غیرمجاز	غیرمجاز	قرقیزستان
مجاز	غیرمجاز	مصر
مجاز	مجاز	افریقای جنوبی
مجاز	مجاز	زیمبابوه

ادامه جدول ۱. وضعیت قانونی کشت و واردات محصولات

تراریخته در کشورهای مختلف تا سال ۲۰۲۵

Continued table 1. Legal status of cultivation and import of genetically modified (GM) products in various countries up to 2025

وضعیت قانونی	وضعیت قانونی	نام کشور	ردیف
واردات	کشت تجاری		
محصولات	محصولات		
تراریخته	تراریخته		
مجاز	مجاز	زامبیا	
مجاز	مجاز	کنیا	
مجاز	مجاز	نیجریه	
مجاز	غیرمجاز	مالی	
مجاز	غیرمجاز	غنا	
غیرمجاز	غیرمجاز	ماداگاسکار	
مجاز	مجاز	سودان	
مجاز	مجاز	اسپانیا	
مجاز	مجاز	پرتغال	
مجاز	مجاز	جمهوری چک	
مجاز	مجاز	اسلواکی	
مجاز	مجاز	رومانی	
مجاز	مجاز	انگلستان	
مجاز	غیرمجاز	ایرلند شمالی، اسکاتلند، ولز	
مجاز	غیرمجاز	فرانسه	
مجاز	غیرمجاز	آلمان	
مجاز	غیرمجاز	ایتالیا	
مجاز	غیرمجاز	هلند	
مجاز	غیرمجاز	اوکراین	
مجاز	غیرمجاز	مجارستان	
مجاز	غیرمجاز	نروژ	
مجاز	غیرمجاز	سوئد	
مجاز	غیرمجاز	فنلاند	
مجاز	غیرمجاز	اتریش	
مجاز	غیرمجاز	کرواسی	
مجاز	غیرمجاز	قبرس	
مجاز	غیرمجاز	یونان	

آرژانتین، هند و کانادا هستند که این کشورها نقش کلیدی در تولید جهانی این محصولات ایفا می‌کنند (Saba & Balwan, 2023). توزیع میزان تولید کشورهای عمده تولیدکننده عبارت‌اند از: ایالات متحده آمریکا (۵۹ درصد محصولات تراریخته جهانی)، آرژانتین (۲۰ درصد)، کانادا (۶ درصد)، برزیل (۶ درصد)، چین (۵ درصد)، پاراگوئه (۲ درصد)، هند (۱ درصد) و آفریقای جنوبی (۱ درصد) (Viljoen et al., 2006).

جدول (۱) یک نمای کلی از وضعیت قوانین تراریخته در حوزه کشت و واردات در کشورهای مختلف ارائه می‌کند.

جدول ۱. وضعیت قانونی کشت و واردات محصولات تراریخته در کشورهای مختلف تا سال ۲۰۲۵

Table 1. Legal status of cultivation and import of genetically modified (GM) products in various countries up to 2025

وضعیت قانونی	وضعیت قانونی	نام کشور	ردیف
واردات	کشت تجاری		
محصولات	محصولات		
تراریخته	تراریخته		
مجاز	غیرمجاز	ایران	
مجاز	مجاز	هند	
مجاز	مجاز	چین	
مجاز	مجاز	استرالیا	
مجاز	غیرمجاز	نیوزلند	
مجاز	مجاز	کانادا	
مجاز	مجاز	ایالات متحده	
مجاز	مجاز	کوبا	
مجاز	مجاز	هندوراس	
مجاز	مجاز	برزیل	
مجاز	مجاز	کلمبیا	
مجاز	مجاز	آرژانتین	
مجاز	مجاز	اروگوئه	
مجاز	مجاز	شیلی	
غیرمجاز	غیرمجاز	ونزوئلا	
مجاز	غیرمجاز	مکزیک	
مجاز	غیرمجاز	روسیه	
مجاز	غیرمجاز	ترکیه	
مجاز	مجاز	پاکستان	
مجاز	غیرمجاز	ازبکستان	
مجاز	غیرمجاز	تاجیکستان	
مجاز	غیرمجاز	ترکمنستان	
مجاز	غیرمجاز	مغولستان	
مجاز	غیرمجاز	عمان	
مجاز	غیرمجاز	عربستان	
مجاز	غیرمجاز	امارات متحده عربی	

لهستان	غیرمجاز	مجاز
بلغارستان	غیرمجاز	مجاز
سوئیس	غیرمجاز	مجاز
صربستان	غیرمجاز	مجاز
لیتوانی	غیرمجاز	مجاز
یونانی و هرزگوین	غیرمجاز	مجاز

۱۱۳ برابری، نشان‌دهنده استقبال مداوم از فناوری‌های مرتبط با گیاهان تراریخته و نقش مهم آن‌ها در کشاورزی جهانی است (Güneş, Movassaghi, Unsai, & Güneş, 2021). این رقم در سال ۲۰۲۳ حدود ۲۰۶ میلیون هکتار بوده است (Cheng et al., 2024).

تا سال ۲۰۱۸، ۹۹ درصد سطح زیر کشت گیاهان تراریخته به گیاهان روغنی نظیر سویا، ذرت، پنبه و کانولا (کلزا) اختصاص یافته است. این محصولات عمده‌تاً برای تولید روغن و خوراک دام استفاده می‌شوند، همچنین پنبه برای الیاف نساجی کار می‌رود (Güneş et al., 2021; Stanciu & Sarbu, 2019). سایر گیاهان تراریخته نظیر چغندرقد، سیب‌زمینی، بادمجان، کدو، پاپایا و ... سهم بسیار کوچکی از کل سطح زیر کشت گیاهان تراریخته را به خود اختصاص می‌دهند (Liana, 2012). بر اساس جدیدترین آمار پنبه، سویا، ذرت، کلزا، چغندرقد، یونجه، نیشکر، بادمجان، برنج و گندم، محصولات تراریخته کشت‌شده در سطح جهان هستند. بر اساس این آمار میزان کشت به ترتیب متعلق به سویای تراریخته (۱۰۰،۹ میلیون هکتار)، ذرت تراریخته (۶۹،۳ میلیون هکتار)، پنبه تراریخته (۲۴،۱ میلیون هکتار) و کلزای تراریخته (۱۰،۲۰ میلیون هکتار) می‌باشد (Cheng et al., 2024).

جدول (۲) نمای کلی از میزان و سهم تولید این محصولات ارائه می‌کند (Applications (ISAAA), 2023; Cheng et al., 2024; Monitor, 2025).

از زمان آغاز تولید تجاری گیاهان تراریخته در سال ۱۹۹۶، سطح زیر کشت این محصولات به‌طور پیوسته افزایش یافته است. با این حال، توزیع جغرافیایی این سطوح کشت‌شده نامتعادل است. ایالات متحده با سهم ۴۰،۳ درصد، برزیل با ۲۳،۳ درصد و آرژانتین با ۱۳،۴ درصد، به‌تنهایی بیش از ۷۵ درصد از سطح کشت جهانی گیاهان تراریخته را به خود اختصاص داده‌اند (Stanciu & Sarbu, 2019). بر اساس جدیدترین داده‌ها، ایالات متحده با ۷۴،۴ میلیون هکتار در صدر قرار دارد و پس از آن برزیل با ۶۶،۹ میلیون هکتار و آرژانتین با ۲۳،۱ میلیون هکتار قرار دارند. کانادا با ۱۱،۵ میلیون هکتار در رتبه چهارم و هند با ۱۲،۱ میلیون هکتار در رتبه پنجم قرار دارند. از دیگر کشورهای قابل توجه می‌توان به پاراگوئه، چین و پاکستان اشاره کرد، اگرچه مناطق کشت آن‌ها به‌طور قابل توجهی کمتر است (Cheng et al., 2024).

این افزایش در تولید و سطح زیر کشت، با توجه به گزارش سرویس بین‌المللی برای دستیابی به کاربردهای کشاورزی-بیوتکنولوژی (ISAAA)، چشمگیر است. بر اساس این گزارش، سطح جهانی تولید محصولات تراریخته از ۱،۷ میلیون هکتار در سال ۱۹۹۶ به ۱۹۱،۷ میلیون هکتار در سال ۲۰۱۸ افزایش یافته است. این رشد

جدول ۲. وضعیت میزان و سهم تولید محصولات تراریخته عمده

Table 2. Status of the quantity and share of major genetically modified (GM) crop production

محصول	سطح تقریبی کشت تراریخته (میلیون هکتار)	کشورهای اصلی تولیدکننده	سهم کشور (میلیون هکتار)	درصد تقریبی از سطح جهانی
سویا	۱۰۵	برزیل	45.7	45.7%
		آمریکا	33.5	33.5%
		آرژانتین	16.2	16.2%
		پاراگوئه	3.7	3.7%
		سایر	0.9	0.9%
ذرت	۶۹	آمریکا	34.8	50.2%
		برزیل	20.2	29.1%
		آرژانتین	6.9	10.0%
		آفریقای جنوبی	2.2	3.2%
		سایر	5.2	7.5%

پنبه	۲۴	هند	11.2	46.5%
		آمریکا	4.5	18.7%
		چین	2.8	11.6%
		پاکستان	1.9	7.9%
		سایر	3.7	15.3%
کانولا	۱۲	کانادا	11.5	94.3%
		آمریکا	0.5	4.1%
		استرالیا	0.2	1.6%

محصولات تحت شرایط خاصی مجاز است. این رویکرد محتاطانه برای مدیریت ریسک‌های زیست‌محیطی و بهداشتی مرتبط با تراریخته‌ها اتخاذ شده است.

از سوی دیگر، کشورهای نظیر برزیل، هند، چین، کانادا و ایالات متحده، علاوه بر مجاز دانستن کشت تجاری محصولات تراریخته، واردات آن‌ها را بدون موانع قانونی انجام می‌دهند. این کشورها به دلایل اقتصادی و ارتقای بهره‌وری کشاورزی از محصولات تراریخته حمایت می‌کنند.

این مقررات تأثیر زیادی بر تجارت بین‌المللی و تولید محصولات تراریخته دارند. درحالی‌که برخی کشورها با مجاز دانستن کشت و واردات این محصولات، از مزایای اقتصادی مانند افزایش تولید و کاهش هزینه‌های تولید بهره‌مند می‌شوند، کشورهایی که محدودیت‌ها و ممنوعیت‌ها را اعمال کرده‌اند ممکن است با چالش‌هایی در تأمین مواد غذایی و رقابت تجاری مواجه شوند.

زمینه‌های ممنوعیت کشت محصولات تراریخته

دلایل اصلی محدودیت‌ها و ممنوعیت‌ها شامل نگرانی‌های زیست‌محیطی، ایمنی غذایی، تأثیرات بهداشتی و مسائل اقتصادی است. برخی از نگرانی‌های مهم عبارت‌اند از انتقال ژن به گونه‌های غیر هدف، مقاومت به علف‌کش‌ها، تأثیرات بر تنوع زیستی و اثرات احتمالی بر سلامت انسان نظیر آلرژی‌ها یا بیماری‌های مزمن در بسیاری از کشورها عوامل متعددی زمینه ممنوعیت کشت محصولات تراریخته را فراهم می‌آورد که از مسائل حقوقی و قانونی تا نگرانی‌های عمومی و ملاحظات اکولوژیکی را شامل می‌شود. یکی از عوامل کلیدی، پتنت‌ها و حقوق مالکیت معنوی است که به شرکت‌های اجازه می‌دهد کنترل شدیدی بر بذرهای

ازجمله مهم‌ترین صفاتی که به واسطه انتقال ژن به این گیاهان منتقل شده است، مقاومت به علف‌کش‌ها می‌باشد که فراوان‌ترین ویژگی اصلاح‌شده در میان گیاهان تراریخته است. این صفت به کشاورزان این امکان را می‌دهد که به‌طور مؤثرتر با علف‌های هرز مقابله کرده و در نتیجه بازدهی محصول را افزایش دهند (Schütte et al., 2017). سایر صفات عمده بر اساس مساحت کشت جهانی به ترتیب شامل، مقاومت به آفات (محصولات Bt)، ویژگی‌های ترکیبی (مقاومت به علف‌کش‌ها و آفات) (Rozas et al., 2022) بوده است. مابقی صفات (تحمل به خشکی، بهبود محتوای تغذیه‌ای مانند برنج طلایی با ویتامین A، مقاومت به ویروس‌ها، تحمل به شوری، تأخیر در رسیدن محصول و افزایش ماندگاری و بهبود ترکیب روغن مانند سویا حاوی اسید اولئیک بالا) زیر یک درصد کشت جهانی را شکل می‌دهند (Jiao, Deng, Li, Zhang, & Cai, 2010; Rozas et al., 2022; Türkoğlu, 2007; Zhang et al., 2014).

با توجه به داده‌های ارائه‌شده در مورد مقررات قانونی محصولات تراریخته در سطح جهانی، می‌توان به چند نکته کلیدی پی برد. نخست، تنوع قابل‌توجهی در سیاست‌ها و قوانین این حوزه وجود دارد. برخی کشورها مانند ایالات متحده، برزیل و آرژانتین کشت تجاری این محصولات را به‌طور گسترده مجاز کرده‌اند، درحالی‌که بسیاری از کشورهای اروپایی و برخی کشورهای آسیایی محدودیت‌های سخت‌گیرانه‌ای را اعمال کرده‌اند. این تفاوت‌ها عمدتاً به دلایل فرهنگی، اقتصادی، اجتماعی و نگرانی‌های زیست‌محیطی شکل گرفته است. کشورهایی نظیر ایران، نیوزلند، مکزیک، فرانسه و آلمان اجازه کشت محصولات تراریخته را نمی‌دهند، اما واردات این

مزیت‌های اقتصادی و بهره‌دهی بالاتر هستند، حفظ کند. این رویکرد نشان‌دهنده تمایل فرانسه به حفظ هویت کشاورزی سنتی خود است، درحالی‌که با چالش‌های رقابتی ناشی از بهره‌وری بیشتر و پیشرفت‌های فناوری محصولات تراریخته در سطح جهانی مواجه است (Kuntz, 2014).

دخالت افراد فاقد سواد و صلاحیت علمی لازم و بعضاً دارای نگرش‌های توهّم توطئه

یکی از چالش‌های مهم در بحث‌های علمی، به‌ویژه در زمینه‌هایی پیچیده مانند فناوری‌های تراریخته، وجود ادعاها و نظراتی است که توسط افرادی بدون تخصص و صلاحیت علمی مطرح می‌شود.

دخالت افراد فاقد تخصص در موضوعات علمی و انتشار نظریه‌های توطئه یکی از چالش‌های جدی در مباحث علمی پیشرفته، به‌ویژه در زمینه‌هایی پیچیده مانند فناوری‌های تراریخته است. در عین برگزاری جلسات علمی متعدد با حضور کارشناسان متخصص موافق و مخالف در این حوزه (Agricultural Biotechnology Information Center, 1399; EnsafNews, 1396; kayhannewspaper, 1396; Research Institute for Islamic Culture and Thought, 1395) وجود نظرات موافق محققان حوزه فقه اسلامی (Alidoost & Pourghahramani, 2021; biosafetysociety, 1396; Ghanizadeh Mahdih & Fatemeh, 2018; Mohammadi & Mortazavi Mehr, 2017) نظر موافق برخی روحانیون اصولی بلندپایه پیرامون تراریخته‌ها (Iran Biotechnology Information Database, 1401; Salisbilwebsite, 1395; Seyed Mojtaba Noormafidi Information Center) و نظرات موافق یا مشروط برخی مراجع تقلید شیعه (biosafetysociety, 1396; Sobhani, 1403) اصرار برخی مخالفین بر تداوم بیان نظرات شامل توهّمات توطئه و اطلاعات نادرست همچنان پابرجاست. بیان مکرر این قسم دیدگاه‌ها در فضای عمومی توأم با حمایت و پروپگاندای رسانه‌ای برخی نهادها می‌تواند منجر به

تراریخته اعمال کنند و این مسئله باعث نگرانی کشاورزان در مورد وابستگی به این شرکت‌ها و افزایش هزینه‌ها شده است. همچنین، ترس عمومی ناشی از اطلاعات نادرست یا عدم آگاهی کافی در مورد ایمنی و تأثیرات این محصولات بر سلامت انسان و محیط‌زیست نیز در مقاومت به کشت تراریخته نقش دارد. ملاحظات اکولوژیکی از جمله خطر احتمالی تأثیرات نامطلوب بر تنوع زیستی و آلودگی ژنتیکی نیز از دیگر دلایل ممنوعیت کشت تراریخته است. به‌علاوه، مسائل سیاسی نیز نقش مهمی ایفا می‌کنند. به‌عنوان مثال دو کشور آلمان و فرانسه به‌عنوان بزرگ‌ترین مخالفین کشت تراریخته‌ها در این زمینه قابل توجه هستند. در کشور آلمان به دلیل فشارهای عمومی و سرمایه‌گذاری بالا در بخش‌های کشاورزی سنتی، مخالف کشت محصولات تراریخته هستند. با این حال، آلمان از سوی دیگر سعی دارد تا به فناوری‌های پیشرفته در زمینه محصولات تراریخته دست یابد. خرید سهام شرکت معروف مونسانتو توسط شرکت‌های آلمانی نشان می‌دهد که این کشور در حال تنظیم سیاست‌های خود به گونه‌ای است که بتواند تعادلی بین استفاده از فناوری‌های نوین و نگرانی‌های اجتماعی و محیط‌زیستی حفظ کند (Rozas et al., 2022). همچنین پیشینه‌های فلسفی تاریخی مخالفت با تکنولوژی در این کشور را نیز می‌بایست در نظر گرفت. به‌عنوان مثال برخی فلاسفه آلمانی نظیر کارل مارکس فیلسوف شهیر آلمانی (Perelman, 1978) کارل کائوتسکی پرداز برجسته حزب سوسیال‌دموکرات آلمان (Gleberzon, 1978) هربرت مارکوزه (Sedgwick) و ... با اشاره به اینکه علم و تکنولوژی ابزارهایی در دست نخبگان بورژوا هستند، نوعی بدبینی نسبت به پیشرفت‌های علمی را بخصوص در میان طبقات کارگر-کشاورز و اقشار کم‌درآمد تقویت کردند. از سوی دیگر، فرانسه با تأکید بر حفظ کشاورزی کلاسیک و سنتی، تلاش دارد تا بخش کشاورزی خود را که مبتنی بر روش‌های غیرتراریخته است، از شکست در مقابل محصولات تراریخته که دارای

یددار (EnsafNews, 1402) و ضدویروس بودن ضریح‌ها و اماکن متبرکه شیعه (AsreIran, 2398; BaharNews, 1398) مؤید این روش استنتاجی ایشان و طرفداران این جریان است. توجه به این نکته ضروریست که مشابه این‌گونه کنش‌ها در روحانیون سایر ادیان بخصوص جریانات ارتدکس آن‌ها مشاهده می‌شود (independent, 1399) و اصولاً جریانات با این قسم تفکرات در همه جوامع وجود دارند.

امنیتی کردن مسئله و ایجاد حساسیت برای نهادهای امنیتی به جهت ورود در حوزه‌های تخصصی (InstituteofMedicalJurisprudence, 1396) توطئه

صهیونیستی خواندن ترا ریخته‌ها (TasnimNewsAgency, 1394) ادعای ایجاد سرطان (TasnimNewsAgency, 1396) ایجاد اختلالات دستگاه گوارش و دستگاه ایمنی بدن، افزایش سرعت پیر شدن و ناباروری و نازایی و سقط‌جنین (Kahyhannews, 1395) تهدید ضمنی تولیدکنندگان محصولات تراریخته به مشمولیت حکم افساد فی الارض (Sobhani, 1403) و ... از جمله روش‌های پروپاگاندای رسانه‌ای این جریان است.

موضوعات علمی، به‌ویژه در حوزه‌های پیشرفته و پیچیده مانند مهندسی ژنتیک و تولید محصولات تراریخته، نیاز به درک عمیق و دقیق از اصول علمی و داده‌های تجربی دارند. افرادی که بدون دانش و تخصص کافی در این زمینه‌ها اظهارنظر می‌کنند، ممکن است به‌جای ارائه اطلاعات مستند، نظرات غیرعلمی و نادرستی را منتشر کنند که می‌تواند موجب گمراهی عمومی تأثیرات عمیق منفی زیادی بر پذیرش فناوری‌های نوین شود. این توهّمات اغلب بر پایه ناآگاهی، عدم درک صحیح از علم و یا برخی مقاصد خاص به دنبال برانگیختن احساسات عمومی هستند.

سرطان‌زا بودن

یکی از نگرانی‌های رایج در مورد محصولات تراریخته، ادعای سرطان‌زایی آن‌هاست. این ادعاها به‌ویژه در میان عموم مردم و در رسانه‌ها مطرح‌شده و باعث نگرانی‌های

تأثیر منفی بر نگرش عمومی و عدم پذیرش اجتماعی این دسته فناوری‌های نوین شود.

دخالت برخی روحانیون فاقد تخصص و مدعی عدم امکان اتکا به نتایج حاصل از علوم تجربی یکی از مصادیق این مسئله است (Linesnews, 1402; WestAzerbaijanIslamicPropagandaDirectorat, 1402, e). برخی از افراد این جریان با استناد به آیات قرآن، تلاش می‌کنند تفاسیر جدید و بعضاً شاذ از مبانی علوم تجربی ارائه دهند؛ در برخی موارد حتی ادعاها شامل زیر سؤال بردن اصلی‌ترین مبانی علم زیست‌شناسی ملکولی (ایجاد صفات توسط ژن‌ها) به‌عنوان پایه تمام پیشرفت‌های سده اخیر در حوزه درمان و کشاورزی و دارویی و بوده است. این ادعاها با استناد به قرآن و تلاش برای کشف مبانی علوم تجربی از آیات قرآن بوده است (StudentNewsNetwork, 1396b) و یا در موردی دیگر، مبانی علم شیمی مانند جدول تناوبی عناصر نیز مورد تشکیک این جریان قرار گرفته است (University, 1403). افزون بر این برخی موارد با اتکا به ادله دینی تراریخته را مصداق تغییر در خلقت خداوند معرفی می‌کنند (StudentNewsNetwork, 1396a). در برخی موارد حمایت‌های رسانه‌ای توسط ارگان‌های رسمی و حوزوی از این جریان صورت گرفته است (howzehinformationdatabase, 1399; StudentNewsNetwork, 1396c).

این رویکردها که اغلب از جریان‌های غیراصولی و دارای گرایش‌ات اخباری ناشی می‌شود، در موضوعات مختلف علمی نیز مشاهده می‌شود؛ به‌عنوان مثال، در دوران همه‌گیری کرونا این جریان کنش‌هایی در مباحث فقهی مربوطه داشته‌اند. این کنش‌ها (بعضاً با تکیه بر نظرات برخی متخصصین دارای گرایش‌های توهّم توطئه) منجر به شکل‌گیری ادعاها غیرمنطقی و شاذ نظیر هم‌جنس‌گرایی در اثر استفاده از واکسن، وجود تراشه‌های الکترونیکی در واکسن‌ها (AsreIran, 1399; EntekhabNews, 1399; KhabarOnlineNewsAgency, 1399) اثر واکسیناسیون روی اندازه آلت تناسلی، مخالفت با نمک

محصولات تراریخته معمولاً مشابه با محصولات غیرتراریخته است و تفاوت‌های عمده‌ای در آن‌ها وجود ندارد (Jiao et al., 2010; Wang et al., 2012) که بتواند باعث افزایش خطر سرطان شود.

انتشار مقاله‌ای درباره سرطان‌زا بودن ذرت تراریخته مقاوم به یک نوع علف‌کش، موجی از تبلیغات منفی علیه محصولات تراریخته به راه انداخت. نویسندگان مدعی بودند که این ذرت و به‌طور ضمنی سایر محصولات تراریخته می‌تواند تومورهایی به‌اندازه توپ بسکتبال ایجاد کنند و از اتحادیه اروپا خواستار تجدیدنظر در مجوزهای مرتبط شدند؛ اما بررسی دقیق مقاله نشان داد که موش‌های مورد استفاده ذاتاً مستعد سرطان بودند و بدون محصولات تراریخته نیز در این نژاد تومور ایجاد خواهد شد. ایرادات علمی دیگری همچون نبود تکرار آزمایش و تحلیل آماری معتبر نیز وجود داشت. درنهایت، نتایج این تحقیق مردود اعلام شد و مجله منتشرکننده در سال ۲۰۱۳ آن را از اعتبار خارج کرد ("The Lie Scandal: A Critique on "Moment of Truth" Video," 2012; Loening, 2015).

درعین‌حال، مانند هر فناوری دیگری، مهم است که در استفاده و مصرف محصولات تراریخته، اصول احتیاط و نظارت دقیق رعایت شود. مطالعات و تحقیقات علمی باید به‌طور مداوم ادامه یابد تا اطمینان حاصل شود که این محصولات در طول زمان ایمن باقی می‌ماند.

وجود سم در تراریخته‌ها

یکی از نگرانی‌های رایج درباره محصولات تراریخته (GMO)، ادعای وجود سموم در این محصولات است. این ادعا بیشتر به محصولات تراریخته‌ای که برای مقاومت در برابر آفات یا علف‌کش‌ها طراحی شده‌اند، مانند ذرت یا سویا، مربوط می‌شود. به‌عنوان مثال، برخی محصولات تراریخته با استفاده از ژن‌های یک باکتریایی به نام Bt (*Bacillus thuringiensis*) توانایی تولید پروتئین‌هایی را دارند که برای برخی از آفات کشنده است اما برای انسان و سایر موجودات بی‌ضرر است. سم به هر ماده‌ای اطلاق می‌شود که در مقادیر یا غلظت‌های خاص می‌تواند برای موجود زنده مضر باشد

جدی شده است. برای پاسخ به این ادعاها، ضروری است که به شواهد علمی و تحقیقات معتبر در این زمینه توجه کنیم.

بسیاری از مطالعات علمی و تحقیقات تجربی گسترده‌ای که تاکنون انجام شده‌اند، گزارش کرده‌اند که ارتباط قطعی بین مصرف محصولات تراریخته و افزایش ریسک سرطان در انسان‌ها تاکنون ارائه نشده است (Dona & Arvanitoyannis, 2009; Jiang & Fang, 2019; Kouchakzadeh & Shokouhifar, 2013; Touyz, 2005). بسیاری از سازمان‌های معتبر علمی و بهداشتی جهانی مانند سازمان بهداشت جهانی (WHO) (FAO, 2022) سازمان خواروبار جهانی (FAO) ((WHO, 2014a)) و همچنین آکادمی‌های ملی علوم و مؤسسات تحقیقاتی نظیر آژانس غذا و داروی آمریکا (FDA, 2024) گزارش رسمی دولت کانادا (Canada, 2024) آژانس بازرسی مواد غذایی کانادا (CFIA) (CFIA, 2020) انجمن سرطان‌شناسی آمریکا (Society, 2020) آژانس تنظیم مقررات سلامت برزیل (ANVISA) (Borges, Arantes, Fernandes, 2018) کمیسیون ملی بهداشت چین (Cao, 2021) سرویس استانداردهای غذایی استرالیا نیوزلند (FSANZ) (FSANZ, 2024)، و مؤسسات پژوهشی مستقل نظیر Cancer Research UK بزرگ‌ترین سازمان مستقل تحقیقات سرطان در جهان (UK, 2022) ضمن ارزیابی محصولات تراریخته از نظر ایمنی تأکید کرده‌اند که محصولات تراریخته‌ای که به بازار عرضه می‌شوند، تحت آزمایش‌های دقیق و استانداردهای ایمنی قرار می‌گیرند.

محصولات تراریخته قبل از ورود به بازار، از نظر ایمنی به‌ویژه در زمینه‌های سلامت و محیط‌زیست، مورد ارزیابی‌های دقیق قرار می‌گیرند. این ارزیابی‌ها شامل آزمایش‌های سم‌شناسی و بررسی اثرات طولانی‌مدت مصرف این محصولات است (FDA, 2024). به‌طور کلی، هیچ مدرک علمی قوی وجود ندارد که نشان دهد تراریخته‌ها به‌طور مستقیم باعث سرطان می‌شوند (Jiang & Fang, 2019). از نظر علمی، ترکیبات و ویژگی‌های

گروه‌ها و رسانه‌ها مطرح شده است (BasijNews, 1395; ISNANewsAgency-Gilan, 1398; JameJamnews, 1397; kayhanNewspaper, 1394; Loening, 2015; MizanNewsAgency, 1396). برای تحلیل این ادعاها و درک واقعیت‌های موجود، لازم است به شواهد علمی و منطقی توجه کنیم و اطلاعات موجود را به‌طور دقیق بررسی کنیم. برای تحلیل این ادعاها و درک واقعیت‌های موجود، لازم است که به چند نکته مهم توجه کنیم.

شبکه‌های مالی و مدیریتی شرکت‌های بزرگ به‌طور کلی بسیار پیچیده و چندلایه هستند. این شرکت‌ها اغلب دارای سهام‌داران و سرمایه‌گذاران متنوع از کشورهای مختلف هستند که ممکن است به‌طور مستقیم یا غیرمستقیم در فعالیت‌های مالی و مدیریتی شرکت‌ها دخیل باشند. به‌عنوان مثال شرکت معروف مونسانتو چندین بار دچار تغییرات در سهام‌داران خود شده است (Ongun & de Pinho, 2020). به همین دلیل، شناسایی وابستگی‌های خاص و بررسی دقیق فعالیت‌های یک شرکت در سطح جهانی می‌تواند بسیار دشوار باشد و نیازمند تحقیقات عمیق و دقیق است.

در ایران، شرکت خوشگوار مشهود، یکی از تولیدکنندگان نوشیدنی، بارها به داشتن ارتباط با شرکت‌های صهیونیستی متهم شده است (Nournews, 1402; StudentNewsNetwork, 1403; TasnimNewsAgency, 1395). در سال ۱۳۸۷، درخواست بررسی این ادعا مطرح شد و وزیر صنایع وقت به شرکت خوشگوار مشهد مهلتی داد تا وضعیت ارتباط خود با شرکت کوکاکولا که یکی از برندهای جهانی است و متهم به صهیونیستی بودن مشخص کند. پس از بررسی‌ها اعلام شد که خوشگوار وابستگی به گروه‌های صهیونیستی ندارد و ادله کافی برای اثبات این ارتباط وجود ندارد. این شرکت نیز هرگونه ارتباط با رژیم صهیونیستی را تکذیب کرد و نهایتاً مجوز ادامه فعالیت صادر شد ((IRNA, 1387).

در یک مورد دیگر در سال ۱۳۷۳، شرکت سوئیسی نستله از شمول تحریم‌های مقرر در «قانون حمایت از انقلاب اسلامی مردم فلسطین» و «قانون تحریم

(Forouhar Vajargah, Mohammad, Mohammad Reza, Shabani Ali, & Aliakbar, 2021; Gupta & Gupta, 2019). با این حال، درک این نکته مهم است که مفهوم سمیت نسبی است و مقادیر کم و کنترل شده بسیاری از مواد می‌تواند اثرات مفیدی داشته باشد. همچنین یک ترکیب در یک موجود زنده می‌تواند سم و در موجود دیگر بی‌اثر یا دارای اثرات مفید باشد.

به‌عنوان مثال، سدیم کلرید که به‌عنوان نمک طعام شناخته می‌شود در استفاده از آب‌نمک برای غرغره کردن و درمان گلودرد در غلظت‌های مناسب می‌تواند نقش سمی علیه باکتری‌ها داشته باشد. آنتی‌بیوتیک‌ها نیز مثال دیگری هستند که در درمان عفونت‌های باکتریایی بسیار مفید هستند که در دوزهای کنترل شده، خاصیت سمی علیه باکتری‌های مضر دارند. عصاره‌های طبیعی گیاهان نیز همین الگو را دنبال می‌کنند. به‌عنوان مثال، عصاره گیاهانی مانند سیر، نعنا، گل‌گاوزبان، اکالیپتوس و... دارای خواص سمی علیه میکروب‌ها هستند (Dadgar T et al., 2007; Razavi Nastaran et al., 2016). این عصاره‌ها می‌توانند رشد باکتری‌ها یا قارچ‌ها را مهار کنند و در درمان عفونت‌ها مفید باشند.

در نتیجه، نگرانی‌ها درباره وجود سم در محصولات تراریخته بیشتر ناشی از سوءتفاهم‌ها یا اطلاعات ناقص است. همان‌طور که در مثال‌های ذکر شده مانند نمک، آنتی‌بیوتیک‌ها و عصاره‌های گیاهی دیده می‌شود، بسیاری از مواد می‌توانند خاصیت سمی علیه عوامل بیماری‌زا داشته باشند، بدون اینکه به انسان آسیبی برسانند؛ بنابراین، استفاده کنترل شده و علمی از محصولات تراریخته دارای برخی ترکیبات خاص می‌تواند ایمن و حتی مفید باشد، بدون آنکه خطری جدی برای سلامت عمومی ایجاد کند.

وابستگی تراریخته‌ها به شرکت‌های صهیونیستی

ادعاهایی مبنی بر اینکه فناوری‌های تراریخته به‌طور خاص به‌وسیله صهیونیست‌ها توسعه داده شده و هدفشان مقابله با جمعیت مسلمانان و کنترل جهان است، کلاً در میان برخی

نام برد. طرفه اینکه حتی تندروترین روحانیون و مخالفان تراریخته نیز به‌طور معمول از این فناوری‌های پیشرفته و محصولات متهم به حمایت از اسرائیل یا ارتباطات صهیونیستی در زندگی عادی خود به‌وفور استفاده می‌کنند این واقعیت نشان می‌دهد که فناوری‌های مدرن به‌طور جهانی موردپذیرش قرار گرفته‌اند و ادعای صهیونیستی بودن آن‌ها و در نتیجه اجتناب از استفاده از این محصولات، در مقام عمل حتی توسط مدعیان این شایعات نیز بی‌پایه شمرده می‌شود.

برای تصمیم‌گیری آگاهانه پیرامون محصولات تراریخته، ضروری است که به شواهد علمی معتبر مراجعه کرده و از اطلاعات نادرست و شایعات پرهیز شود. در عین حال، باید نگرانی‌های عمومی را در نظر گرفته و در گفتگوهای سازنده با ذینفعان مختلف شرکت کنیم. حمایت از مقررات قانونی و نظارتی مناسب نیز برای اطمینان از ایمنی و استفاده مسئولانه از محصولات تراریخته بسیار مهم است. با ترکیب روش‌های علمی، شفافیت و مشارکت عمومی، می‌توان به تحقق بهره‌وری و پایداری در تولید مواد غذایی رسید و نگرانی‌های عمومی را به‌طور مؤثر مدیریت کرد و نهایتاً منجر به پذیرش و استفاده ایمن و مسئولانه از محصولات تراریخته شود که بتوان از پتانسیل این فناوری برای بهبود امنیت غذایی و پایداری کشاورزی بهره‌مند شویم.

نتیجه‌گیری و پیشنهادها

محصولات تراریخته از طریق اصلاح ژنتیکی تولید می‌شوند و به‌منظور بهبود ویژگی‌هایی نظیر مقاومت به آفات، بیماری‌ها و شرایط نامساعد محیطی طراحی شده‌اند. این محصولات با پتانسیل افزایش تولید، کاهش مصرف سموم شیمیایی و بهبود کیفیت غذایی، توجه زیادی را به خود جلب کرده‌اند. تحقیقات علمی متعدد نشان داده‌اند که محصولات تراریخته به‌طور کلی ایمن برای مصرف انسان هستند و هیچ خطر سلامتی قابل‌توجهی ندارند. علاوه بر این، این محصولات می‌توانند به کاهش استفاده از آفت‌کش‌ها و کاهش تأثیرات منفی بر محیط‌زیست کمک کنند.

اسرائیل» خارج شد. بر این اساس، دولت وقت در چارچوب قانون جلب و حمایت از سرمایه‌گذاری‌های خارجی، به نسله اجازه داد تا با مشارکت سرمایه‌گذاران خصوصی ایرانی، طرح تولید شیر خشک و غذای کودک را در شهرستان کرج به اجرا درآورد (Donya-e-Eqtasad, 1387). این تأییدیه در سال‌های بعد نیز ادامه یافت (MehrNews, 1389). این شرکت نیز بارها توسط جریان‌ات تندرو به صهیونیستی بودن متهم شده است (jahannews, 1388; MashreghNews, 1390).

فناوری‌های تراریخته به‌طور جهانی توسط دانشمندان و محققان از کشورهای مختلف توسعه‌یافته و تحت نظر سازمان‌های بین‌المللی علمی و بهداشتی و دولت‌ها و نهادهای مختلف قرار دارند. ادعای اینکه این فناوری‌ها به‌طور خاص توسط گروه‌های صهیونیستی کنترل و توسعه‌یافته‌اند، فاقد پایه علمی و مستند است. فناوری تراریخته، مانند بسیاری از فناوری‌های دیگر، نتیجه همکاری و تحقیق گسترده‌تری از سوی محققان در سطح جهانی است و به‌هیچ‌وجه محدود به یک گروه خاص نمی‌شود.

علاوه بر محصولات تراریخته سایر ابزارها و فناوری‌های مدرن، نظیر هواپیما، رایانه و تلفن همراه که به‌طور گسترده‌ای در ایران و جهان استفاده می‌شوند نیز در معرض این‌گونه اتهامات هستند. به‌عنوان مثال شرکت‌های بوشینگ (TasnimNewsAgency, 1393; Welle, 1401) و ایرباس (Asrekhbarnews, 1395) در صنعت هواپیمایی، هیوندای (FarsNewsAgency, 1402) و رنو (HamshahriOnline, 1395) کاترپیلار (TasnimNewsAgency, 1403) در صنعت خودروسازی، اینتل، آی بی ام (Gerdabwebsite, 1395; MizanNewsAgency, 1391) و اچ‌پی (MizanNewsAgency, 1402) در حوزه ساخت پردازنده‌های کامپیوتری، نوکیا (MizanNewsAgency, 1395)، آیفون (MehrNewsAgency, 1400) و سامسونگ (Gerdabwebsite, 1390) در حوزه تلفن‌های همراه و حتی غول‌های حوزه آی تی نظیر گوگل (MizanNewsAgency, 1402) را می‌توان

پاسخ عمومی، به کاهش شایعات و گسترش آگاهی عمومی کمک می‌کند. همچنین، تولید محتوای آموزشی ساده و قابل فهم برای عموم مردم و محدود کردن فعالیت‌های غیر کارشناسانه و تئوری‌های توطئه در رسانه‌ها و شبکه‌های اجتماعی، می‌تواند به روشنگری بیشتر کمک کند. دومین حوزه، بهبود وضعیت قوانین و مقررات مربوطه است. شفافیت و پاسخگویی در فرآیندهای ارزیابی و نظارت بر محصولات تراریخته می‌بایست تقویت شود. همکاری‌های بین‌المللی برای ایجاد استانداردهای مشترک و تشویق مشارکت عمومی در تصمیم‌گیری‌های مربوط به این محصولات نیز ضروری است. سومین حوزه، سرمایه‌گذاری در تحقیق و توسعه می‌باشد. حمایت از مطالعات بلندمدت برای بررسی اثرات طولانی‌مدت محصولات تراریخته و توسعه محصولات جدید با مزایای بیشتر می‌تواند به اعتمادسازی عمومی کمک کند. همچنین، تقویت همکاری بین بخش‌های دولتی و خصوصی برای تسریع تحقیقات و نوآوری بسیار مهم است.

اجرای این اقدامات می‌تواند به پذیرش اجتماعی و در نتیجه استفاده مسئولانه و ایمن از محصولات تراریخته کمک کرده و زمینه‌های لازم را برای بهره‌مندی کشور از مزایای این فناوری مهیا کند.

با این حال، نگرانی‌های عمومی در مورد محصولات تراریخته به قوت خود باقی است. این نگرانی‌ها شامل تأثیرات زیست‌محیطی، ایمنی غذایی و مسائل اقتصادی است و منجر به وضع قوانین و مقررات متفاوتی در کشورهای مختلف در خصوص کشت و واردات این محصولات شده است. به عنوان مثال، کشورهای زیادی از جمله ایالات متحده، برزیل، کانادا، چین و کشورهای اروپایی کشت و واردات محصولات تراریخته را مجاز دانسته‌اند، در حالی که کشورهایی نظیر ایران، آلمان، فرانسه، روسیه و... تنها واردات این محصولات را مجاز می‌دانند و کشت آن‌ها را ممنوع کرده‌اند. همچنین، برخی کشورها مانند ونزوئلا و الجزایر با ممنوعیت کامل کشت و واردات محصولات تراریخته مواجه هستند.

برای رفع این نگرانی‌ها و افزایش پذیرش عمومی محصولات تراریخته، ضروری است که اقداماتی در سه حوزه کلیدی انجام شود.

در ابتدا، تقویت ارتباطات علمی و عمومی اهمیت ویژه‌ای دارد. ایجاد کانال‌های ارتباطی مستقیم بین محققان این حوزه، کشاورزان، مصرف‌کنندگان و سیاست‌گذاران می‌تواند به تبادل اطلاعات و رفع سوء تفاهم‌ها کمک کند. استفاده از رسانه‌های اجتماعی برای انتشار اطلاعات علمی و برگزاری جلسات پرسش و

منابع

- (CFIA), C. F. I. A. (2020). *HEALTH CANADA'S ROLE IN THE REGULATION OF PRODUCTS FROM BIOTECHNOLOGY*. Retrieved from https://www.canada.ca/content/dam/hc-sc/migration/hc-sc/sr-sr/alt_formats/hpfb-dgpsa/pdf/pubs/reg_bio_mod-eng.pdf
- (FSANZ), F. S. A. N. Z. (2024). *Safety assessments of GM foods*. Retrieved from <https://www.foodstandards.gov.au/consume/r/gmfood/safety#:~:text=FSANZ%20conducts%20a%20thorough%20safety,and%20New%20Zealand%20food%20supply>
- (IRNA), I. (1387). Mashhad's Khosholy denies any connection with Zionist companies. Retrieved from <https://www.irna.ir/news/9362727/>
- (ISAAA), I. S. f. t. A. o. A.-b. A. (2024). *ACCOMPLISHMENTREPORT* 2024. Retrieved from https://www.isaaa.org/resources/publications/annualreport/2024/pdf/ISAAA-2024-Accomplishment-Report.pdf?utm_source=chatgpt.com
- Agarwal, P. K., Shukla, P. S., Gupta, K., & Jha, B. (2013). Bioengineering for salinity tolerance in plants: state of the art. *Molecular biotechnology*, 54, 102-123.
- Agricultural Biotechnology Information Center. (1399). Reviewing the status of genetically modified products in the Parliament's

- Article 90 Committe. Retrieved from <http://agbiotech.ir/ne/1445-1445.html>
- Alidoost, S., & Pourghahramani, B. (2021). Genetically modified products from an Islamic perspective. *The second national conference on interdisciplinary research on the quran and biological sciences*, 1(2), 1261-1267.
- Alinejad, K., Afifi, M. E., & Mowgli, M. (2023). Evaluation of Isfahan's urban development and its role in the process of changes in urban vegetation cover. *Geographical Sciences (Applied Geography)*, 19(43), 1-28.
- Amna, Qamar, S., Tantray, A. Y., Bashir, S. S., Zaid, A., & Wani, S. H. (2020). Golden rice: genetic engineering, promises, present status and future prospects. *Rice Research for Quality Improvement: Genomics and Genetic Engineering: Volume 2: Nutrient Biofortification and Herbicide and Biotic Stress Resistance in Rice*, 581-604.
- Applications (ISAAA), I. S. f. t. A. o. A.-b. (2023). ISAAA Briefs.
- AsreIran. (1399). Abbas Tabrizian's new claim: Vaccination causes homosexuality. Retrieved from <https://www.asriran.com/fa/news/769614/>
- AsreIran. (2398). Extremists attack the shrines of Hazrat Masoumeh (SA) and Imam Reza (AS) / The door of the shrine was broken / Protest against the closure of the shrine due to Corona. Retrieved from <https://www.asriran.com/fa/news/719101>
- Asrekhbarnews. (1395). Israel to buy 6 advanced helicopters from Airbus. Retrieved from <https://asrkhbar.com/fa/news/105890/>
- BaharNews. (1398). Hazrat Masoumeh Shrine: The shrine's structures are anti-coronavirus. Retrieved from <https://www.baharnews.ir/news/202396/>
- BasijNews. (1395). GM crops are a tool for Zionist influence. Retrieved from <https://basijnews.ir/fa/news/8835418/>
- biosafetysociety. (1396). A critique of some jurisprudential doubts regarding genetic engineering and genetically modified products. Retrieved from <http://biosafetysociety.ir/content/395/>
- Borges, B. J. P., Arantes, O. M. N., Fernandes, A. A. R., Broach, J. R., & Fernandes, P. M. B. (2018). Genetically modified labeling policies: Moving forward or backward? *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 6, 181.
- Brookes, G., & Barfoot, P. (2016). Global income and production impacts of using GM crop technology 1996–2014. *GM crops & food*, 7(1), 38-77.
- Canada, G. o. (2024). *Novel foods: Safety of genetically modified foods*. Retrieved from <https://www.canada.ca/en/health-canada/services/food-nutrition/genetically-modified-foods-other-novel-foods/safety.html>
- Cao, C. (2021). China's evolving biosafety/biosecurity legislations. *Journal of Law and the Biosciences*, 8(1), 1sab020.
- Cheng, X., Li, H., Tang, Q., Zhang, H., Liu, T., & Wang, Y. (2024). Trends in the global commercialization of genetically modified crops in 2023. *Journal of Integrative Agriculture*, 23(12), 3943-3952.
- Dadgar T, Ghaemi E, Bazouri M, Asmar M, Mazandarani M, Sayfi A, & H, B. (2007). The antibacterial effects of 20 herbal plants on methicillin resistant and sensitive S.aureus in golestan province.
- Dona, A., & Arvanitoyannis, I. S. (2009). Health risks of genetically modified foods. *Critical reviews in food science and nutrition*, 49(2), 164-175.
- Donya-e-Eqtesad. (1387). By what criteria are "Zionist enterprises" identified? Retrieved from <https://donya-e-eqtesad.com/%D8%A8%D8%AE%D8%B4-%D8%A8%D8%A7%D8%B2%D8%B1%DA%AF%D8%A7%D9%86%DB%8C-4/491620-%D8%AA%D8%B4%D8%AE%DB%8C%D8%B5-%D8%A8%D9%86%DA%AF%D8%A7%D9%87-%D9%87%D8%A7%DB%8C-%D8%B5%D9%87%DB%8C%D9%88%D9%86%DB%8C%D8%B3%D8%AA%DB%8C-%D8%A8%D8%A7-%DA%A9%D8%AF%D8%A7%D9%85-%D9%85%D8%B9%DB%8C%D8%A7%D8%B1>

- EnsafNews. (1396). Transgenic, white or black? | Debate. Retrieved from <https://ensafnews.com/79675/>
- EnsafNews. (1402). Hossein Ravazadeh, the discoverer of "Spider gene transmission through goats" and "The secret message of the Totoleh's Atal Matel" and "The connection between vaccines and..." and the person whom Shahab Haeri Yazdi holds responsible for his father's death. Retrieved from <https://ensafnews.com/434786/>
- EntekhabNews. (1399). Tabrizian: Those who get vaccinated develop homosexual tendencies. Retrieved from <https://www.entekhab.ir/fa/news/600591/>
- FAO. (2022). *Genetically modified crops: Safety, benefits, risks and global status*. Retrieved from <https://www.fao.org/policy-support/tools-and-publications/resources-details/en/c/1477336/>
- FarsNewsAgency. (1402). What companies are the economic supporters of the Zionist regime? Retrieved from <https://farsnews.ir/news/14020802000211/>
- FDA. (2024). *Agricultural Biotechnology*. Retrieved from <https://www.fda.gov/food/consumers/agricultural-biotechnology>
- Forouhar Vajargah, Mohammad, I., Mohammad Reza, Shabani Ali, & Aliakbar, H. (2021). Study on lethal Effects on Silver Nano Particles of Goldfish (*Carassius Auratus Gibelio*). *Journal of Environmental Science and Technology*, 23(5), 71-80.
- Gebretsadik, K., & Kiflu, A. (2018). Challenges and opportunities of genetically modified crops production; future perspectives in ethiopia, review. *The Open Agriculture Journal*, 12(1).
- Gerdabwebsite. (1390). Samsung rushed to the aid of the Zionist regime. Retrieved from <https://gerdab.ir/fa/news/9430/>
- Gerdabwebsite. (1391). What is American Intel doing in Haifa? Retrieved from <https://gerdab.ir/fa/news/10782/>
- Ghanizadeh Mahdiyeh, & Fatemeh, T. (2018). The mandate of producing transgenic products from the perspective of Imamiyah jurisprudence. *Journal of Genetic Engineering and Biosafety*, 7(2), 267-279.
- Gleberzon, W. (1978). Marxist Conceptions of the Intellectuals. *Historical Reflections/Réflexions Historiques*, 81-97.
- Güneş, E., Movassaghi, H., Unsal, F., & Güneş, N. T. (2021). GMO Policies and Practices: A Global Overview with Special Focus on Turkey. *Policy Issues in Genetically Modified Crops*, 29-56.
- Gupta, P., & Gupta, P. (2019). Poisonous and Venomous Organisms. *Concepts and Applications in Veterinary Toxicology: An Interactive Guide*, 165-185.
- HamshahriOnline. (1395). Renault did not fulfill its commitments in Iran. Retrieved from <https://www.hamshahronline.ir/news/349718/>
- Henseler, M., Piot-Lepetit, I., Ferrari, E., Mellado, A. G., Banse, M., Grethe, H., . . . Hélaine, S. (2013). On the asynchronous approvals of GM crops: Potential market impacts of a trade disruption of EU soy imports. *Food Policy*, 41, 166-176.
- howzehinformationdatabase. (1399). A new classification of science from the perspective of jurisprudence of guidance. Retrieved from <https://hawzah.net/fa/Article/View/109640/>
- independent, p. (1399). Conservative rabbi: Coronavirus vaccine 'could turn people gay'. Retrieved from <https://www.independentpersian.com/node/115286>
- InstituteofMedicalJurisprudence. (1396). The need to examine the security dimensions of transgenics. Retrieved from <http://tebona.ir/456/>
- IranBiotechnologyInformationDatabase. (1401). For the supremacy of Islam and the Islamic world, and the supremacy of Muslims, scientific work in the field of biotechnology must be carried out to the fullest extent. Retrieved from <https://irbic.ir/20362/>
- ISNANewsAgency-Gilan. (1398). GMOs are Zionism's plan to destroy Muslim health. Retrieved from <https://www.isna.ir/news/gilan-133928/>
- jahannews. (1388). Documents proving that Nestle is a "Zionist" company. Retrieved from <https://www.jahannews.com/analysis/95266/>

- Jalalian Hamid, Pashazade Asghar, & Farivash, N. (2016). Affecting Demographic Factors and Physical Changes in Settlements around Metropolises and Related Consequences, Case Study: Gharachak City. *Urban Ecological Research*, 7(13), 33-50.
- Jam-eJamnews. (1397). Zionists at the helm of seed and GMO companies. Retrieved from <https://www.magiran.com/article/3730718>
- James, C. (2014). ISAAA Briefs brief 49 Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2014. In: ISAAA Briefs, no. Brief.
- Javanshiri Mehdi, Anabastani Ali Akbar, & Hamdollah, S. Q. (2020). Analysis and foresight of physical developments in peri-urban rural settlements located within the boundaries of Mashhad metropolis. *Spatial Planning*, 10(2), 119-148.
- Jiang, S., & Fang, W. (2019). Misinformation and disinformation in science: examining the social diffusion of rumours about GMOs. *Cultures of Science*, 2(4), 327-340.
- Jiao, Z., Deng, J., Li, G., Zhang, Z., & Cai, Z. (2010). Study on the compositional differences between transgenic and non-transgenic papaya (*Carica papaya* L.). *Journal of food composition and analysis*, 23(6), 640-647.
- Kahyhannews. (1395). Threats and expulsions of critics of risky genetically modified products! Retrieved from <https://kayhan.ir/fa/news/71483/>
- Kavhiza, N. J., Zargar, M., Prikhodko, S. I., Pakina, E. N., Murtazova, K. M.-S., & Nakhaev, M. R. (2022). Improving crop productivity and ensuring food security through the adoption of genetically modified crops in sub-Saharan Africa. *Agronomy*, 12(2), 439.
- kayhanNewspaper. (1394). "GMOs": Zionist conspiracy against the Muslim population. Retrieved from <https://kayhan.ir/fa/news/68501/>
- kayhannewspaper. (1396). Five hours debate between supporters and opponents of genetically modified crops. Retrieved from <https://kayhan.ir/fa/news/115968/>
- KhabarOnlineNewsAgency. (1399). How did Sheikh Tabrizian know that anyone who gets the coronavirus vaccine will become homosexual? Retrieved from <https://www.khabaronline.ir/news/411018/>
- Khooshebast, F., Parandeh, P., & Hoshyar, A. (2014). Examine the capabilities and limitation of agricultural tourism in the province of Gilan, with a sustainable development approach. *Indian Journal of Scientific Research*, 4(6), 976-981.
- Kouchakzadeh, A., & Shokouhifar, N. (2005). Release of transgenic crops and biosafety.
- Krishna, V. V., & Qaim, M. (2012). Bt cotton and sustainability of pesticide reductions in India. *Agricultural Systems*, 107, 47-55.
- Kumar, K., Gambhir, G., Dass, A., Tripathi, A. K., Singh, A., Jha, A. K., . . . Rakshit, S. (2020). Genetically modified crops: current status and future prospects. *Planta*, 251(4), 91.
- Kumar, P., Kumar, A., Dhiman, K., & Srivastava, D. K. (2022). Recent progress in cereals biofortification to alleviate malnutrition in India: an overview. *Agricultural Biotechnology: Latest Research and Trends*, 253-280.
- Kuntz, M. (2014). The GMO case in France: politics, lawlessness and postmodernism. *GM crops & food*, 5(3), 163-169.
- Liana, P. D. (2012). Transgenic Plants—Advantages Regarding Their Cultivation, Potentially Risks and Legislation Regarding GMO's. *Transgenic Plants—Advances And Limitations*, YÖ Ciftci (ed), 415.
- The Lie Scandal: A Critique on "Moment of Truth" Video. (2012). *Journal of Biosafety*, 5(1), 83-94. Retrieved from <http://journalofbiosafety.ir/article-1-49-fa.html>
- Linesnews. (1402). The Islamic Republic will not get anywhere with its positivist ideology!/There are two fundamental problems with current science. Retrieved from <https://khootoot.ir/fa/news/15036/>
- Loening, U. E. (2015). A challenge to scientific integrity: a critique of the critics of the GMO rat study conducted by Gilles-Eric Seralini et al.(2012). *Environmental Sciences Europe*, 27, 1-9.
- MashreghNews. (1390). Is Nestle really Zionist? Retrieved from <https://www.mashreghnews.ir/news/60943/>
- Mathur, V., Javid, L., Kulshrestha, S., Mandal, A., & Reddy, A. A. (2017). World cultivation of genetically modified crops: opportunities

- and risks. *Sustainable agriculture reviews*, 45-87.
- MehrNews. (1389). Nestle is not Zionist/Does not accept Israeli order registration system. Retrieved from <https://www.mehrnews.com/news/1134704/>
- MehrNewsAgency. (1400). New Zionist infiltration into all apple products. Retrieved from <https://www.mehrnews.com/news/5304425/>
- MizanNewsAgency. (1395). What are the Zionist brands? / Use of Zionist products in Muslim countries! Retrieved from <https://www.mizanonline.ir/fa/news/192263/>
- MizanNewsAgency. (1396). Zionism and the global GM trade. Retrieved from <https://www.mizanonline.ir/fa/news/289478/>
- MizanNewsAgency. (1402). International brands under fire; what do we know about companies supporting the Zionist regime? Retrieved from <https://www.mizanonline.ir/fa/news/4754626/>
- Mohammadi, Z., & Mortazavi Mehr, A. (2017). Jurisprudential review of genetically modified products. *The first international conference and the third national conference on management and humanities research*, 40-50.
- Mokhtari Hoshi, H., & Moradi, A. (2021). Environmental consequences of the water crisis in Iran. *Political Organizing of Space papers*, 3(2), 117-131.
- Monitor, G. A. (2025). Global GM Crop Area 2023 Review. In.
- Nagaraj, S., Rajasekaran, R., Palaniappan, J., Rangasamy, S., Narayanasamy, C., & Narayanan, M. B. (2024). Emerging technological developments to address pest resistance in Bt cotton. *Journal of Cotton Research*, 7(1), 30.
- Nournews. (1402). The relationship between the Happy Company and Coca-Cola America, according to documents. Retrieved from <https://nournews.ir/fa/news/>
- Ongun, A., & de Pinho, P. S. (2020). The Bayer-Monsanto Deal: One of the worst corporate deals ever?
- Perelman, M. (1978). Karl Marx's theory of science. *Journal of Economic Issues*, 12(4), 859-870.
- Qaim, M., & Kouser, S. (2013). Genetically modified crops and food security. *PloS one*, 8(6), e64879.
- Rani, S. J., & Usha, R. (2013). Transgenic plants: Types, benefits, public concerns and future. *Journal of Pharmacy Research*, 6(8), 879-883.
- Razavi Nastaran, Molavi Choubini Zahra, Salehian Dehkordi Mahsa, Saleh Riahi Saideh, Salehian Dehkordi Mehboobeh, & Sedighe, M. C. (2016). A review of the antibacterial properties of essential oils and extracts of some Iranian medicinal plants. *Journal of Shahrekord University of Medical Sciences*, 17(6), 41-52.
- ResearchInstituteForIslamicCultureandThought. (1395). Examining the Shariah Permissibility of Consuming Transgenic Products. Retrieved from <https://iict.ac.ir/1395/11/%D8%A8%D8%B1%D8%B1%D8%B3%DB%8C-%D8%AC%D9%88%D8%A7%D8%B2-%D8%B4%D8%B1%D8%B9%DB%8C-%D9%85%D8%B5%D8%B1%D9%81-%D9%85%D8%AD%D8%B5%D9%88%D9%84%D8%A7%D8%AA-%D8%AA%D8%B1%D8%A7%D8%B1%DB%8C%D8%AE%D8%AA%D9%87-2/>
- Rezayan Ahad, & Rezayan, A. H. (2016). Future studies of water crisis in Iran based on processing scenario. *Iranian JOURNAL of Ecohydrology* 3(1), 1-17.
- Rozas, P., Kessi-Pérez, E. I., & Martínez, C. (2022). Genetically modified organisms: adapting regulatory frameworks for evolving genome editing technologies. *Biological Research*, 55.
- Saba, N., & Balwan, W. K. (2023). Genetic Pollution: A Safe or Risky Bet. *Sch Acad J Biosci*, 4, 159-162.
- Sajadian Nahid, & Jafar, S. (2020). Pathology of Environmental Sustainability with an emphasis Ahvaz Metropolis. *Sustainability, Development & Environment*, 1(1), 53-67.
- Salisbilwebsite. (1395). Jurisprudential foundations of genetic engineering and genetically

- modified products. Retrieved from <http://alidoost.ir/persian/articles/22804/>
- Schütte, G., Eckerstorfer, M., Rastelli, V., Reichenbecher, W., Restrepo-Vassalli, S., Ruohonen-Lehto, M., . . . Mertens, M. (2017). Herbicide resistance and biodiversity: agronomic and environmental aspects of genetically modified herbicide-resistant plants. *Environmental Sciences Europe*, 29, 1-12.
- Sedgwick, P. Natural Science and Human Theory: A Critique of Marcuse. *Socialist Register* 1966, 163-192.
- SeyedMojtabaNoormafidiInformationCenter. Ayatollah Seyyed Mojtaba Noormofidi in an interview with Imam Hareem: Transgenic Jurisprudence. Retrieved from <https://m-noormofidi.com/1395/07/22/%D8%A2%D8%B8%D8%AA-%D8%A7%D9%84%D9%84%D9%87-%D8%B3%DB%8C%D8%AF-%D9%85%D8%AC%D8%AA%D8%A8%DB%8C-%D9%86%D9%88%D8%B1%D9%85%D9%81%DB%8C%D8%AF%DB%8C-%D8%AF%D8%B1-%D9%85%D8%B5%D8%A7%D8%AD%D8%A8%D9%87-11/>
- Sharma, S., Ghosh, P., Kar, C., & Ghosh, R. (2025). Anticipating Viral Challenges: A Perspective on Phytochemicals against Existing and Emerging Viruses. *Anti-Infective Agents*, 23(3), E22113525312781.
- Shelke, D. B., Chambhare, M. R., Nikalje, G. C., & Nikam, T. (2023). Improvement of soybean crop for yield, stress tolerance, and value-added products using a transgenic approach. *Advances in Agriculture*, 2023(1), 8166928.
- Shoghi, R., Molaee Hashjin, N., & Rezaei, P. (2023). Analysis of the factors affecting the changes in the rural land-use system (case study: Astane-ye-Ashrafiyeh rural areas in the north of Iran). *Journal of Sustainable Rural Development*, 7(2), 245-254.
- Smyth, S., Khachatourians, G. G., & Phillips, P. W. (2002). Liabilities and economics of transgenic crops. *Nature biotechnology*, 20(6), 537-541.
- Sobhani, H. (1403). Feasibility of compliance with sentence of the corruption on earth for the producers and suppliers of unauthorized trans products; with an approach to islamic jurisprudence *Criminal Law Doctrines of Islamic Countries*, 2(1), 26-45. Retrieved from <https://www.noormags.ir/view/fa/articlepage/2215104>
- Society, A. C. (2020). American Cancer Society Updates Guideline for Diet and Physical Activity. Retrieved from <https://www.cancer.org/cancer/latest-news/american-cancer-society-updates-guideline-for-diet-and-physical-activity.html#:~:text=Genetically%20modified%20crops%20are%20made,that%20they%20affect%20cancer%20risk.>
- Stanciu, S., & Sarbu, R. (2019). Research on the use of GMOs in Romanian food production. *J East Eur Res Bus Econ*, 2019, 2169-0367.
- StudentNewsNetwork. (1396a). Ayatollah Tabrizian: The issue of genetically modified organisms is an example of change in divine creation. Retrieved from <https://snn.ir/fa/news/628202/>
- StudentNewsNetwork. (1396b). Hojjatoleslam Ali Keshvari: We have 5 categories of debates and objections to genetically modified organisms. Retrieved from <https://snn.ir/fa/news/628203/>
- StudentNewsNetwork. (1396c). Hojjatoleslam Ali Keshvari: We have 5 categories of debates and objections to genetically modified organisms/One of our objections is the questionable safety of genetically modified organisms. Retrieved from <https://snn.ir/fa/news/628203/>
- StudentNewsNetwork. (1403). The tail of the rooster in the pleasant agreement between Coca-Cola and Tel Aviv/Is Tel Aviv financed by Iranian companies? Retrieved from <https://snn.ir/fa/news/1161625/>
- Sun, L., Hu, R., Shen, G., & Zhang, H. (2013). Genetic engineering peanut for higher drought-and salt-tolerance.
- Tabashnik, B. E., & Gould, F. (2012). Delaying corn rootworm resistance to Bt corn. *Journal of economic entomology*, 105(3), 767-776.

- Taheripour, F., Mahaffey, H., & Tyner, W. E. (2016). Evaluation of economic, land use, and land-use emission impacts of substituting non-GMO Crops for GMO in the United States.
- TasnimNewsAgency. (1393). Israel to buy 300 smart bombs from the US. Retrieved from <https://www.tasnimnews.com/fa/news/1393/09/06/571806/>
- TasnimNewsAgency. (1394). The spread of "genetically modified products" is a Zionist conspiracy to make the Iranian nation sick. Retrieved from <https://www.tasnimnews.com/fa/news/1394/11/26/1000583>
- TasnimNewsAgency. (1395). Another American beverage trademark registered in Iran + documents. Retrieved from <https://www.tasnimnews.com/fa/news/1395/02/18/1067810/>
- TasnimNewsAgency. (1396). Genetically modified products are the cause of increased breast cancer and heart disease / Genetically modified products are questionable. Retrieved from <https://www.tasnimnews.com/fa/news/1396/06/12/1508919>
- TasnimNewsAgency. (1403). Megacorporations: The Actors Behind America's Support for the Zionist Regime. Retrieved from <https://www.tasnimnews.com/fa/news/1403/04/26/3123117/>
- Tirado, R., & Cotter, J. (2010). Ecological farming: Drought-resistant agriculture. *Exeter, UK: Greenpeace Research Laboratories.*
- Touyz, L. (2013). Genetically modified foods, cancer, and diet: Myths and reality. *Current Oncology*, 20(2), 59-61.
- Türkoğlu, S. (2007). *Screening of tomato seeds for genetic modification and identification of genetically modified ripening delayed tomato seeds.* Middle East Technical University,
- UK, C. R. (2022). Do genetically modified (GM) foods cause cancer? Retrieved from <https://www.cancerresearchuk.org/about-cancer/causes-of-cancer/cancer-myths/do-genetically-modified-foods-cause-cancer>
- University, R. (1403). Holding a specialized meeting on "Introducing the Jurisprudential Table of Conquest". Retrieved from <https://razi.ac.ir/fa/web/acu/w/%D8%B1%DA%AF%D8%B2%D8%A7%D8%B1%D8%B8C-%D9%86%D8%B4%D8%B3%D8%AA-%D8%AA%D8%AE%D8%B5%D8%B5%DB%8C-%C2%AB%D9%85%D8%B9%D8%B1%D9%81%DB%8C-%D8%AC%D8%AF%D9%88%D9%84-%D9%81%D9%82%D9%87%DB%8C-%D8%AA%D8%B3%D8%AE%DB%8C%D8%B1%C2%BB>
- Van Eenennaam, A. L. (2013). GMOs in animal agriculture: time to consider both costs and benefits in regulatory evaluations. *Journal of animal science and biotechnology*, 4, 1-14.
- Viljoen, C., Dajee, B., & Botha, G. (2006). Detection of GMO in food products in South Africa: Implications of GMO labelling. *African journal of biotechnology*, 5(2), 73-82.
- Wang, Y., Xu, W., Zhao, W., Hao, J., Luo, Y., Tang, X., . . . Huang, K. (2012). Comparative analysis of the proteomic and nutritional composition of transgenic rice seeds with Cry1ab/ac genes and their non-transgenic counterparts. *Journal of Cereal Science*, 55(2), 226-233.
- Welle, D. (1401). Contract with Boeing: Strengthening Israel's Capability Against the Iranian Threat. Retrieved from <https://www.dw.com/fa-ir/a-63003819>
- WestAzerbaijanIslamicPropagandaDirectorate. (1402). Anyone who relies on current science, which is based on Bikini's classification, will face a lack of knowledge. Retrieved from <https://ido-ag.ir/article/395>
- WHO. (2014a). Food, genetically modified. Retrieved from <https://www.who.int/news-room/questions-and-answers/item/food-genetically-modified>
- WHO. (2014b). Frequently asked questions on genetically modified foods. World Health Organization. Retrieved from http://www.who.int/foodsafety/areas_work/food-technology/faq-geneticallymodified-food/en/
- Zhang, L., Yang, X.-d., Zhang, Y.-y., Yang, J., Qi, G.-x., Guo, D.-q., . . . Li, H.-y. (2014).

Changes in oleic acid content of transgenic soybeans by antisense RNA mediated posttranscriptional gene silencing. *International journal of genomics*, 2014(1), 921950.

Zimmermann, R., & Qaim, M. (2004). Potential health benefits of Golden Rice: a Philippine case study. *Food Policy*, 29(2), 147-168.