ISSN: 2676-7309

Plant Genetic Researches

Volume 11, Issue 1 (2024)

Lorestan University

Research Article

http://dx.doi.org/10.22034/PGR.11.1.3

Screening of Different Rice Genotypes Using Functional Markers Related to *Gn1a* gene

Smaeil Talebi Kouyakhi[1], Bahram Maleki Zanjani[2], Mostafa Modarresi[3,*] and Alireza Tarang[4]

1- Ph.D. Student, Department of Plant Production and Genetics, Faculty of Agriculture, University of Zanjan, Zanjan, Iran
2- Associate Professor, Department of Plant Production and Genetics, Faculty of Agriculture, University of Zanjan, Zanjan, Iran
3- Assistant Professor, Rice Research Institute of Iran, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Rasht, Iran
4- Associate Professor, Rice Research Institute of Iran, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Rasht, Iran

*Corresponding author ✉: *m.modaresi@areeo.ac.ir*

Citation: Talebi Kouyakhi, S., Maleki Zanjani, B., Modarresi, M. and Tarang, A. (2024). Screening of different rice genotypes using functional markers related to *Gn1a* gene. *Plant Genetic Researches*, **11(1):** 37-46. http://dx.doi.org/10.22034/PGR.11.1.3

(Received: January 25, 2024; Final Revised: June 9, 2024; Accepted: June 21, 2024; Published online: September 21, 2024)

Extended abstract

Introduction

The increasing global population and the concomitant rise in food demand present one of the most pressing challenges for policymakers and agricultural planners, with Iran being no exception. Although Iran has long-faced limitations in agricultural production resources, especially water and fertile soil, these issues, combined with urbanization, climate change, and population growth, have heightened the demand for food and threatened food security. To address this, it is necessary to focus on both the quantitative and qualitative improvement of agricultural products, as this is one of the most important factors affecting food security. Given the nutritional importance of rice in the Iranian diet and the constraints on agricultural product resources, planning for increased yield per unit area is essential. Instead of relying on imports, we can leverage knowledge and adopt new technologies to boost productivity and improve crop plants performance. It should be kept in mind that increasing the yield of rice is a major goal with many benefits for farmers and managers. One method of rice plant breeding involves identifying genotypes with alleles associated with yield improvement, which can then be introduced to landraces and breeding cultivars. Since yield is a quantitative trait controlled by many genes, one of the key components of yield is the number of grains per panicle. Due to its importance and its effect on increasing yield per unit area, the aim of the present study was to identify rice genotypes with the desired allele using functional markers related to Grain number 1a gene (*Gn1a*). The goal is to identify the genotypes containing the alleles of this gene and use them to enhance the desirable traits of local and improved cultivars.

Materials and methods

In this study, 52 landraces and breeding rice genotypes from the collection of the Rice Research Institute of Iran, were evaluated. After seed cultivation and DNA extraction from fresh plant leaves based on the standard method, Polymerase Chain Reaction (PCR) was performed. The most important step was the annealing of the primer to the target template, which took place at 54 °C. Next, 3% agarose gel was used and stained with a Safe Stain to

©2024 The author(s). This is an open access article distributed under Creative Commons Attribution 4.0 International License (CC BY 4.0), which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source.

visualize the bands on agarose gels. The amplified fragment was ~147 bp for genotypes with large panicle (more than 121 grains per panicle) and 121 bp for other genotypes. In this research, functional markers were used to determine the presence or absence of specific alleles for the gene loci of the studied trait. Thus, the grain number trait was evaluated based on molecular assessments related to the band pattern created by a specific primer pair of the *Gn1a*, which is correlated with the gene locus controlling the grain number trait. Additionally, phenotypic evaluation was conducted in the field. The statistical analysis for this study were performed using SPSS software, and the generalized linear model of logistic regression was used to analyze the correlation between genes.

Results and discussion

In this study, the genetic evaluation of rice cultivars revealed that 15 cultivars were identified with the allele associated with a higher number of grains per panicle, whereas 37 cultivars lacked such a allele. The phenotypic assessment illustrated the reliability and precision of the marker in predicting and distinguishing cultivars for future breeding programs. This marker can be effectively employed for screening rice genotypes based on the number of grains per panicle. Furthermore, it can be suggested that such a functional specific marker is applicable in plant breeding programs for indirect selection. The results of the logistic regression analysis further corroborated such a conclusion.

Conclusions

The results of this research showed that to benefit from the advantages of a high grain number in the panicle and reduce breeding time, the molecular marker *Gn1a* can be used in plant breeding programs to advance the rapid development of generations. Although some of the examined cultivars had high grain numbers, some other genes may affect the grain number per panicle in those cultivars.

Keywords: Rice, Number of grains per panicle, Genetic screening, Functional marker efficiency

پژوهش‌های ژنتیک گیاهی
جلد ۱۱، شماره ۱، ۱۴۰۳
شاپا الکترونیکی: ۷۳۰۹-۲۶۷۶
دانشگاه لرستان
مقاله پژوهشی
http://dx.doi.org/10.22034/PGR.10.1.3

غربالگری ژنوتیپ‌های مختلف برنج با استفاده از نشانگرهای عملکردی مرتبط با ژن *Gn1a*

اسمعیل طالبی کویخی[۱]، بهرام ملکی زنجانی[۲]، مصطفی مدرسی[۳*] و علیرضا ترنگ[٤]

۱- دانشجوی دکتری، گروه تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان، زنجان
۲- دانشیار، گروه تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان، زنجان
۳- استادیار، مؤسسه تحقیقات برنج کشور، سازمان تحقیقات، آموزش وترویج کشاورزی، رشت
٤- دانشیار، مؤسسه تحقیقات برنج کشور، سازمان تحقیقات، آموزش وترویج کشاورزی، رشت

(تاریخ دریافت: ۱٤۰۲/۱۱/۰۵ ؛ تاریخ آخرین ویرایش: ۱٤۰۳/۰۳/۲۰؛ تاریخ پذیرش: ۱٤۰۳/۰٤/۰۱؛ تاریخ انتشار برخط: ۱٤۰۳/۰٦/۳۱)

چکیده

موضوع امنیت غذایی متأثر از عوامل متعددی است که از مهم‌ترین آن‌ها می‌توان به افزایش کمی و کیفی محصولات کشاورزی اشاره نمود. با توجه به نقش برنج در تغذیه روزانه ایرانیان و لزوم افزایش بهره‌وری از منابع محدود سرزمینی برای تأمین نیاز به این محصول مهم، ناچار به افزایش عملکرد در واحد سطح می‌باشیم. شناسایی ژنوتیپ‌هایی که حاوی آلل‌های ژن‌های مرتبط با بهبود عملکرد هستند یکی از روش‌های به‌نژادی گیاهی برنج برای تولید ارقام پرمحصول است. با توجه به اهمیت صفت تعداد دانه در خوشه و اثر آن در افزایش عملکرد در واحد سطح، در این پژوهش، از میان چندین ژن مرتبط با عملکرد، جداسازی ژنوتیپ‌های برنج با استفاده از نشانگر عملکردی مرتبط با ژن *Gn1a* (Grain number 1a) مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور ۵۲ ژنوتیپ محلی و اصلاح شـده برنج از کلکسیون مؤسسه تحقیقات برنج کشور تهیه و صفت تعداد دانه بر اساس ارزیابی‌های فنوتیپی در مزرعه و آزمایش مولکولی مبتنی بر الگوی باندی ایجاد شده با آغازگر اختصاصی ژن *Gn1a* مورد بررسی قرار گرفت. نتایج ارزیابی ژنتیکی ارقام منجر به شناسایی ۱۵ رقم دارای آلل‌های مرتبط با صفت تعداد زیاد دانه و ۳۷ رقم فاقد این آلل‌ها گردید. ارزیابی‌های فنوتیپی نیز اطمینان و دقت نشانگر مورداستفاده برای پیش‌بینی و متمایز کردن ارقام جهت برنامه‌های اصلاحی آتی را تأیید نمود.

واژگان کلیدی: برنج، صفت تعداد دانه در خوشه، غربالگری ژنتیکی، کارایی نشانگر عملکردی

* نویسنده مسئول، آدرس پست الکترونیکی: m.modaresi@areeo.ac.ir

مقدمه

در سال‌های اخیر کاهش اراضی حاصلخیز کشاورزی کشور به‌دلیل افزایش جمعیت شهرنشین، تغییر کاربری اراضی به مسکونی و همچنین تأثیر دیگر فعالیت‌های انسانی همچون بیابان‌زایی، شورشدن اراضی، فرسایش خاک و نهایتاً مدیریت ناپایدار زمین از مهم‌ترین چالش‌های منابع کشور محسوب می‌گردد (Nellemann, 2009). در سال‌های آینده تقاضا برای غذا، به‌دلیل افزایش سیر صعودی رشد جمعیت، فزونی خواهد یافت که تأمین منابع غذایی برای این جمعیت عظیم مستلزم توسعه بخش کشاورزی است. برنج یکی از مهم‌ترین محصولات زراعی در تغذیه ایرانیان به‌شمار می‌رود که نیاز به افزایش عملکرد در واحد سطح این محصول مهم به‌دلیل رشد مداوم جمعیت و افزایش رقابت برای زمین‌های قابل کشت اهمیت یافته است (Jiang *et al*., 2017)؛ از این‌رو افزایش محصول برنج، همواره برای محققان بیوتکنولوژی و به‌نژادی گیاهی در کشور یک هدف اصلی بوده است.

برنامه‌های به‌نژادی برنج تا کنون تولید تعداد زیادی ارقام با عملکرد و کیفیت بالا به‌همراه داشته است (Zhang *et al*., 2014). در اهمیت تولید برنج در ایران می توان به میزان ارز تخصیص یافته به‌منظور واردات برنج (Salami and Bastani, 2017) در جهت جبران کمبود این محصول مهم اشاره داشت که با برنامه‌ریزی درست می‌توان از هدررفت این سرمایه جلوگیری و آن‌را در سایر برنامه‌های توسعه‌ای مثل اشتغال مولد و فقرزدایی استفاده نمود.

عملکرد برنج توسط چندین عامل شامل تعداد گیاه برنج در واحد سطح، تعداد پنجه در هر گیاه، تعداد دانه در هر خوشه، اندازه و وزن دانه تعیین می شود (Ikeda *et al*., 2013). در مطالعه ای توسط یان و همکاران (Yan *et al*., 2009) اجزای عملکرد برنج را شامل وزن دانه، تعداد دانه در خوشه و تعداد خوشه در هر گیاه تعیین نمودند. همچنین از نظر زو و همکاران (Xu *et al*., 2019) اجزای عملکرد برنج عبارتند از تعداد پنجه‌ها، وزن هزار دانه، میزان یا نسبت مجموعه بذری و تعداد دانه در هر خوشه که از میان این عوامل تعداد دانه در هر خوشه به‌طور ویژه بزرگترین و مهم‌ترین عامل در بهبود عملکرد دانه می‌باشد. امروزه گرچه تعداد ژن‌های مرتبط با صفات زراعی از جمله وزن هزار دانه، تعداد خوشه‌ها و انشعابات هر خوشه در برنج تأیید شده است (Zhang *et al*., 2014) ولی استفاده از این تحقیقات و دستاوردهای ژنومیک کاربردی برای به‌نژادی برنج به خوبی استفاده نشده است (Huang *et al*., 2021). از آن‌جایی‌که تعداد دانه یکی از مهم‌ترین صفات اجزای عملکرد برنج محسوب می‌شود، شناسایی ژن‌های مسئول تعداد دانه برای افزایش عملکرد این گیاه اهمیت بالایی دارد (Gouda *et al*., 2019). تعداد دانه بستگی به فعالیت مریستم گل‌آذین برای تولید خوشه‌چه‌های اولیه و ثانویه در طول نمو خوشه دارد (Liu *et al*., 2015). ژن *Gn1a* (*Grain number on chromosome 1*) اولین ژن شناسایی شده مرتبط با عملکرد برنج است که عملکرد دانه را از طریق تنظیم سیتوکینین و تعداد خوشه‌ها کنترل می‌کند. این ژن آنزیم سیتوکینین اکسیداز را کد می‌کند که تجزیه سیتوکنین فعال را تسریع می‌کند. جهش یا کاهش بیان ژن *Gn1a* سبب تجمع سیتوکنین در مریستم‌های گل آذین شده و باعث افزایش تعداد اندام‌های زایشی گردیده و بنابراین افزایش تعداد دانه را به‌همراه خواهد داشت (Ashikari *et al*., 2005). هورمون‌های گیاهی نیز نقش بسیار مهمی در تعیین انشعاب و تعداد خوشه دارند (Li *et al*., 2022a) که از میان آن‌ها، هورمون‌های سیتوکینین یکی از عوامل مهم تعدیل کننده در رشد گل آذین‌ها هستند (Nishimura *et al*., 2004; Riefler *et al*., 2006).

در سال‌های اخیر استفاده از روش‌های مولکولی در اصلاح گیاهان رونق فراوانی یافته است، چرا که روش‌های سنتی زمان‌بر بوده و در عین حال دقت روش‌های مولکولی را ندارند (Liu *et al*., 2022). فناوری‌های نوین، شناسایی ژن‌های دخیل در صفات کمی را تسهیل کرده‌اند و از این طریق بسیاری از ژن‌های مؤثر در عملکرد برنج شناسایی شده‌اند (Ikeda *et al*., 2013; Qian *et al*., 2016).

نشانگرهای ملکولی از ابزارهایی هستند که چشم‌انداز جدیدی را برای پیشرفت‌های به‌نژادی گیاهان فراهم کرده‌اند (MirMohammadi Maibody *et al.*, 2019).در مطالعات متعدد به‌منظور شناسایی ژن‌ها و مکان‌های ژنی، نشانگرهای ژنتیکی مختلفی همچون نشانگرهای RAPD، RFLP و AFLP استفاده شده است که همگی نشانگرهای مبتنی بر DNA تصادفی هستند (Lübberstedt *et al.*, 1998). ازآنجایی‌که صفات کمی توسط چندین ژن یا مکان‌های ژنی کنترل می‌شوند، در ژنوتیپ‌های با قرابت بالا نیز در نتایج استفاده از این نشانگرها اختلاف چشمگیری وجود دارد (Lübberstedt *et al.*, 2005).

نشانگرهای عملکردی معمولاً از مکان‌های چندشکل درون ژن‌هایی که در تنوع صفت فنوتیپی نقش دارند مشتق می‌شوند (Andersen and Lübberstedt, 2003). نشانگرهای عملکردی می‌توانند برای ترکیب هدفمند آلل‌ها در اصلاح ارقام هیبرید و اصلاحی به‌کار برده شوند (Lübberstedt *et al.*, 2005). در برنامه‌های انتخاب دوره‌ای و اصلاح جمعیت می‌توان از نشانگرهای عملکردی به‌منظور جلوگیری از رانش ژنتیکی (Genetic drift) در مکان‌های ژنی اختصاصی استفاده کرد. همچنین امکان استفاده از این نشانگرهای عملکردی برای تشخیص وجود یا عدم وجود آلل‌های ویژه در مکان‌های ژنی صفات مورفولوژیکی برای تمایز ارقام وجود دارد. به‌منظور استفاده از نشانگرهای عملکردی به عواملی همچون: ژن‌های اختصاصی عملکردی، توالی آللی همان ژن‌ها، شناسایی موتیف‌های چندشکلی و عملکردی مؤثر بر فنوتیپ گیاهی در این ژن‌ها و معتبرسازی ارتباط بین چندشکلی‌های DNA و تنوع صفت نیاز است. نشانگرهای عملکردی معمولاً از مکان‌های چندشکلی درون ژن‌هایی که در تنوع صفت فنوتیپی نقش دارند مشتق می شوند (Andersen and Lübberstedt, 2003). تنوع ژنتیکی اساسی‌ترین نیاز برای هر موفقیتی در برنامه اصلاحی یک گیاه زراعی می‌باشد(Sharifi and Aminpanah., 2017). بنابراین با توجه به مطالب ذکر شده، پژوهش حاضر با هدف شناسایی ژنوتیپ‌های حاوی آلل ژن *Gn1a* مرتبط با صفت تعداد دانه در برنج انجام شد، تا بتوان از یافته‌های آن در برنامه‌های به‌نژادی برنج در جهت بهبود صفات زراعی استفاده نمود.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی: به‌منظور انجام آزمایش، از مواد گیاهی شامل ۵۲ ژنوتیپ محلی و اصلاح شـده برنج که از کلکسیون مؤسسه تحقیقات برنج کشور تهیه شد استفاده گردید (جدول ۱). بذور مورد نظر در مزرعه مؤسسه تحقیقات برنج کشور در رشت (واقع در عرض جغرافیایی ۳۷ درجه و ۱۶ دقیقه شمالی و ۴۱ درجه و ۳۶ دقیقه طول جغرافیایی شرقی) در سال زراعی ۱۴۰۰-۱۴۰۱ به روش مرسوم شمال کشور (کرتی غرقابی) کشت شدند. از برگ گیاهچه‌های دوهفته‌ای (مرحله رویشی برگ‌های جوان) تمامی ژنوتیپ‌ها نمونه‌برداری و تا زمان استخراج DNA در فریزر با دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

استخراج DNA: به‌منظور انجام آزمون‌های مولکولی، استخراج DNA از نمونه‌های برگی جوان به روشCTAB انجام شد (Doyle and Doyle, 1990). برای تعیین کیفیت DNA از نحوه تشکیل نوارها برروی ژل آگارز ۰/۷ درصد در الکتروفورز به عنوان معیار استفاده گردید. همچنین از اسپکتروفتومتر نیز به عنوان روشی مکمل برای تعیین کیفیت و کمیت (غلظت) DNA، استفاده گردید.

واکنش PCR: برای جداسازی (غربالگری) نمونه‌ها با استفاده از نشانگرهای عملکردی، از یک جفت آغازگر مبتنی بر توالی ژن *Gn1a* استفاده شد (جدول ۲). پس از تعیین غلظت، برای انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز PCR، نمونه‌های DNA رقیق و سپس واکنش مذکور با استفاده از آغازگرهای نشانگر عملکردی شامل ۴۰ نانوگرم DNA الگو، ۱۰ میلی مولار dNTPs، دو میلی‌مولار $MgCl_2$، ۰/۲ میکرو مولار از هر یک از آغازگرها، بـافر 1X PCR و یـک واحد آنزیم TaqDNA پلیمراز در حجم نهایی۲۰ میکرولیتر انجام شد.

چرخه حرارتی در دستگاه ترموسایکلر با برنامه زمانی شامل واسرشـته‌سازی اولیـه به‌مدت ۵ دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، سـپس ۳۵ چرخه به‌صورت ۱ دقیقه واسرشته‌سازی در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، مرحله اتصال آغازگر ۵۴ درجه سانتی‌گراد، یک دقیقه مرحله بسط در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد و ۱۰ دقیقه بسط نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد بود. پس از انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز، به‌منظور مشاهده نوارهای حاصل از تکثیر، از ژل آگارز ۳

درصد و رنگ‌آمیزی با رنگ ایمن SAFE STAIN استفاده گردید. برای اطمینان از صحت نتایج، آزمایش با دوبار تکرار و حضور یا عدم حضور نوارخای مرتبط با ژن‌ها به‌ترتیب با یک و صفر امتیازدهی گردید (جدول ۱).

جدول ۱- مقایسه‌ی نتایج ارزیابی فنوتیپی و نشانگرهای مولکولی صفت تعداد دانه در خوشه در ژنوتیپ‌های برنج
Table 1. Phenotyping comparison and molecular markers results for Grain Number trait in rice genotypes

ردیف Row	ژنوتیپ Genotype	تیپ (Type)	آلل ژن *Gn1a*	تعداد دانه در خوشه Grain number per panicle
1	A85-01	اصلاح شده (Improved)	-	119.8
2	AbjiBooji	محلی (Local)	+	130
3	Ahlami Tarom1	محلی (Local)	-	90
4	Ahlami Tarom2	محلی (Local)	-	95
5	Anam	اصلاح شده (Improved)	-	140
6	Anbarboo	محلی (Local)	-	120
7	AnbarbooIlam	محلی (Local)	-	140
8	B115	اصلاح شده (Improved)	-	80.67
9	Binam	محلی (Local)	-	105
10	Champaboodar	محلی (Local)	-	180
11	Dom Siah	محلی (Local)	-	140
12	Dom Sorkh	محلی (Local)	-	127
13	Dom Zard	محلی (Local)	-	105
14	Dorfak	اصلاح شده (Improved)	+	140
15	Fajr	اصلاح شده (Improved)	-	160
16	Fuji-minori	محلی (Local)	-	125
17	Ghodsi	اصلاح شده (Improved)	-	130
18	Gohar	اصلاح شده (Improved)	+	205
19	Gohar Mutant 1	اصلاح شده (Improved)	+	150
20	Hassan Saraee	محلی (Local)	-	125
21	Hassan SaraeeAtashgah	محلی (Local)	-	110
22	IR36	اصلاح شده (Improved)	+	180
23	K87	اصلاح شده (Improved)	+	170
24	K96	اصلاح شده (Improved)	-	154.61
25	Keshvari	اصلاح شده (Improved)	+	140
26	Koohsar	اصلاح شده (Improved)	-	110
27	Line 7	اصلاح شده (Improved)	+	134
28	Line23	اصلاح شده (Improved)	-	115
29	MohammadiChaparsar	محلی (Local)	-	100
30	Rash	اصلاح شده (Improved)	+	200
31	RI198-200	اصلاح شده (Improved)	-	180
32	RI198-204	اصلاح شده (Improved)	+	132
33	RI198-205	اصلاح شده (Improved)	-	102.58
34	RI198-206	اصلاح شده (Improved)	-	125
35	RI198-207	اصلاح شده (Improved)	-	150
36	RI198-208	اصلاح شده (Improved)	+	132
37	RI198-209	اصلاح شده (Improved)	+	130
38	RI198-210	اصلاح شده (Improved)	-	120
39	RI198-211	اصلاح شده (Improved)	-	160
40	RI198-212	اصلاح شده (Improved)	-	100
41	RI198-213	اصلاح شده (Improved)	-	120
42	RI198-215	اصلاح شده (Improved)	-	145
43	RI198-216	اصلاح شده (Improved)	+	134
44	RI198-217	اصلاح شده (Improved)	-	130
45	Roshan M	اصلاح شده (Improved)	-	175
46	Saleh	اصلاح شده (Improved)	+	150
47	Sang Tarom	محلی (Local)	-	101
48	Shahpasand	محلی (Local)	-	115
49	T196	محلی (Local)	-	102.56
50	TH1	اصلاح شده (Improved)	-	130
51	Tisa	اصلاح شده (Improved)	-	200
52	Zenit	اصلاح شده (Improved)	+	135

+= وجود آلل ژن تعداد دانه و -= عدم وجود آلل ژن تعداد دانه
+= presence of alles *Gn1a* and - = absence of alles *Gn1a*

جدول ۲- توالی آغازگرهای اختصاصی ژن *Gn1a*

Table 2. Sequence-specific primers of *Gn1a* gene

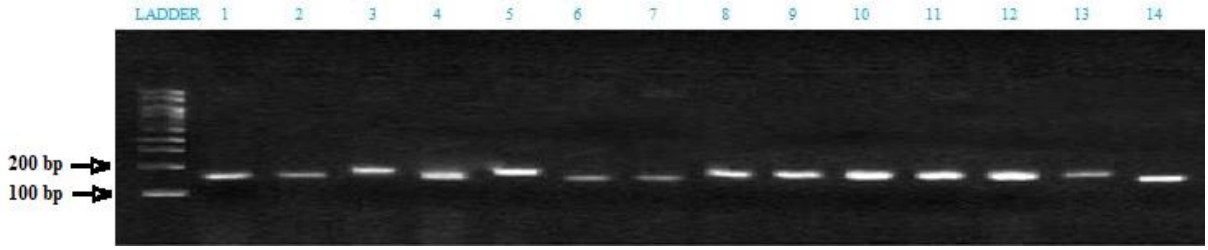
ژن موردنظر Intended Gene	شماره کروموزوم Chromosome number	توالی آغازگر Primer Sequence (5′- 3′)	دمای اتصال (سانتی‌گراد) Annealing Temp.	اندازه باند مورد انتظار (جفت‌باز) Expected Band Size (bp)	منبع Reference
Gn1a	1	F-TTTCCAGAGTATTTTTATGGTTCT R-ATGTTACTGTCCCACCTGAAAC	54	147	(Zeng *et al*., 2017)

تجزیه و تحلیل آماری: محاسبات آماری این مطالعه با استفاده از نرم‌افزار IBM SPSS statistics نسخه ۲۶ و Microsoft Excel نسخه ۲۰۱۹ و برای تحلیل همبستگی از مدل خطی تعمیم یافته رگرسیون لجستیک استفاده شد.

نتایج و بحث

عملکرد دانه یکی از مهم‌ترین و پیچیده‌ترین صفات در برنامه‌های اصلاحی گیاهان به‌شمار می‌رود (Shen *et al*., 2018). افزایش عملکرد و کیفیت برنج برای پاسخ به نیاز و تقاضای بالای این محصول ضروری است؛ در این راستا جستجوی مداوم برای یافتن آلل‌های مطلوب مرتبط با افزایش عملکرد از طریق تجزیه و تحلیل ژنتیکی موتانت‌ها و خزانه‌های ژنی در این گیاه بسیار مهم است (Ma *et al*., 2019).

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که از ۵۲ ژنوتیپ مورد بررسی ۱۵ ژنوتیپ واجد آلل ژن *Gn1a* و ۳۷ ژنوتیپ فاقد آلل ژن *Gn1a* بودند. نشانگر مبتنی بر توالی ژن *Gn1a* توانست ارقام دارای تعداد دانه زیاد در خوشه و ارقام دارای تعداد دانه کمتر در خوشه را به خوبی متمایز نماید؛ به‌طوری که قطعه‌ای به اندازه ۱۴۷ جفت‌باز برای ژنوتیپ‌های دارای تعداد دانه زیاد و قطعه‌ای با ۱۲۱ جفت‌باز برای ژنوتیپ‌های فاقد تعداد دانه زیاد در آشکارسازی توالی‌های تکثیری ایجاد شد (شکل ۱). همترازی توالی‌های تکثیری دریافت شده از بانک ژن NCBI مرتبط با دو گروه فنوتیپی در شکل ۲ نشان می‌دهد که توالی‌های مورد نظر دارای ۸۱/۶۳ درصد شباهت بوده و توالی کوتاه‌تر فاقد ۲۶ نوکلئوتید در موقعیت ۹۵ تا ۱۲۰ می باشد (شکل ۲). در موافقت با نتایج به‌دست آمده، مطالعه گودا و همکاران (Gouda *et al*., 2020) نیز نشان داد که استفاده از ژن *Gn1a* برای تفکیک ۴۸ ژنوتیپ برنج به دو گروه دارای دانه در هر خوشه زیاد (بیشتر از ۱۲۱ دانه) و گروه با تعداد دانه در هر خوشه کم (کمتر از ۱۲۰ دانه) کارایی بالایی دارد (Gouda *et al*., 2020). بر این اساس می‌توان اظهار داشت کـه از این نشانگر اختصاصی عملکردی در برنامه اصلاحی برنج برای گزینش غیر مستقیم می‌توان استفاده نمود.

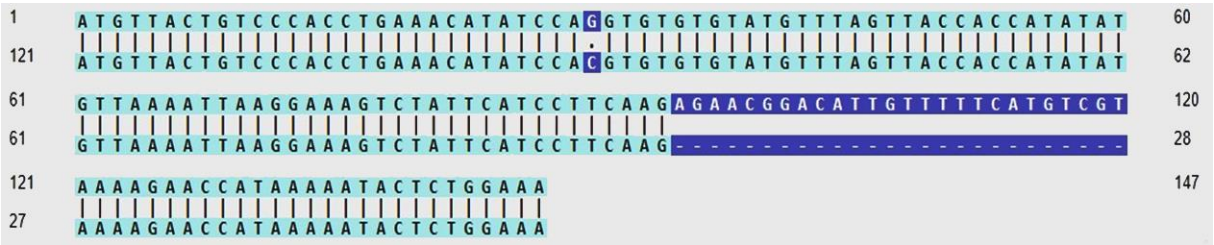


شکل ۱- الگوی نواربندی قطعات DNA تکثیر شده توسط آغازگرهای اختصاصی ژن *Gn1a* در برخی از ژنوتیپ‌های برنج مورد مطالعه

Figure 1. DNA banding patterns amplified by *Gna1* specific primers in some studied rice genotypes

LADDER: نشانگر ۱۰۰ جفت‌باز؛ چاهک ۱: Fuji-minori؛ چاهک ۲: قدسی؛ چاهک ۳: گوهر؛ چاهک ٤: حسن سارایی؛ چاهک ٥: IR36؛ چاهک ٦: کوهسار؛ چاهک ۷: Line 23؛ چاهک ۸: راش؛ چاهک ۹: RI198-204؛ چاهک ۱۰: RI198-208؛ چاهک ۱۱: RI198-209؛ چاهک ۱۲: RI198-216؛ چاهک ۱۳: صالح؛ چاهک ۱٤: سنگ طارم

Lane 5: IR36; Lane 6: Koohsar; Lane 7: Line23; Lane 8: Rash; Lane 9: RI198-204; Lane 10: RI198-208; Lane 11: RI198-209; Lane 12: RI198-216; Lane 13: Saleh; Lane 14: Sang Tarom



شکل ۲- همترازی قطعات حاصل از تکثیر آغازگرهای ژن *Gn1a* برنج در PCR مجازی بر اساس توالی‌های دریافت شده از بانک ژن NCBI

Figure 2. Sequence alignment among fragments amplified from the primer pair *Gan1a in rice*

به‌منظور تحلیل داده‌های صفت تعداد دانه در خوشه و ارتباط آن با گروه‌بندی حاصل از آزمایش مولکولی از تجزیه و تحلیل رگرسیون لجستیک استفاده شد. برازندگی مدل لجستیک در جدول ۲ آمده است. با توجه به معنی‌داری تمام متغیرهای مستقل ($p < 0.05$) صحت مقادیر محاسبه شده در مدل رگرسیونی مورد تأیید قرار گرفت. علاوه بر این با توجه به مقدار محاسبه شده برای نسبت درست‌نمایی لگاریتمی (صفر)، برازش الگوی رگرسیون لجستیک مطلوب بود. مدل برازش داده شده نهایی به صورت زیر محاسبه شد.

رابطه (۱)
$$p(x) = \frac{e^{4.980-.029x}}{1+e^{4.980-.029x}}$$

با توجه به مقادیر محاسبه شده برای ضریب بتا (٤/٩٨٠-) و exp(B) (۰/۰۰۷) وجود رابطه بین آلل ژن *Gn1a* و صفت تعداد دانه در خوشه مورد تأیید قرار گرفت (جدول ۳). پیش از این نیز مطالعاتی برای استفاده از روش رگرسیون لجستیک برای بررسی ارتباط نتایج حاصل از نشانگرهای مولکولی و فنوتیپ مشاهده شده، انجام شده است.

در برنامه‌های به‌نژادی برنج، شناسایی ژنوتیپ‌های دارای صفات شاخص مرتبط با عملکرد دانه، اولین گام ضروری برای تولید برنج پرمحصول می‌باشد (Halilu *et al.*, 2020). توالی‌یابی مجدد ارقام متنوع در ژرم‌پلاسم، به شناسایی و بررسی تغییرات آللی کمک می‌نماید و از این طریق شناسایی ارقام بخشنده جدید و آلل‌های جدید مرتبط با ویژگی‌های مطلوب در برنج به‌منظور بهره برداری بهتر از تنوع ژنتیکی و نهایتاً تولید ارقام پرمحصول تسهیل می‌گردد (Varshney *et al.*, 2018). افزایش تعداد دانه در خوشه برای ژنوتیپ‌های برنج یکی از راه‌کارهای بالقوه برای افزایش عملکرد است و هرمی‌کردن ژن‌های مرتبط با این صفت نقش مهمی را در توسعه ارقام پر محصول برنج بازی می کند (Gouda *et al.*, 2019).

کعب عمیر و همکاران (Kaab Omeyr *et al.*, 2022) در مطالعه‌ای نتیجه گرفتند که وراثت پذیری همراه با پیشرفت ژنتیکی برای صفات تعداد خوشه در واحد سطح، تعداد دانه های پر و درجه رسیدگی می توانند به نتاج هیبرید منتقل شوند و گزینش بر اساس این صفات مؤثرمی‌باشد.

جدول ۳- درصد صحت طبقه‌بندی الگوی رگرسیون لجستیک، متغیرهای معادله، متغیرهای بیرون از معادله، خلاصه مدل

Table 3. Percentage accuracy of the logistic regression model classification, the variables included in the equation, variables excluded from the equation, and a summary of the model are presented.

درصد صحت پیش‌بینی Prediction of percentage accuracy	ژنوتیپ Genotype		درصد کل Overall percentage
	فاقد آلل تعداد دانه Grain number(+)	دارای آلل تعداد دانه Grain number (-)	
26.7	0	15	28.8
89.2	37	0	71.2

عنوان Title	ضریب بتا Beta coefficient	خطای استاندارد Standard error (S.E.)	درجه آزادی D.f	معنی داری sig	Exp (B)
تعداد دانه (Grain number)	0.029	0.012	1	0.014	1.030
ضریب ثابت Constant	-4.980	1.732	1	0.004	0.007
متغیرهای مستقل (*Gn1a*) Independent variables (*Gn1a*)	-	-	1	0.008	-

-2 Log likelihood	Cox & Snell R Square	Nagelkerke R Square
55.527	0.125	0.179

ژن *Gn1a* در رقم لیانورا ۱۱ (یک رقم آپلند خشکی‌پسند) در آمریکای لاتین منجر به افزایش ۲۵ درصدی تعداد دانه در خوشه شده است (Fernando *et al*., 2021). آشیکاری و همکاران (Ashikari *et al*., 2005) در سال ۲۰۰۵ گزارش نموده اند که هرمی‌کردن ژن‌های *Gn1a* و *sd1* می‌تواند صفت تعداد دانه را تا ۲۳ درصد بدون تغییر در اندازه دانه تغییر دهد. همچنین لی و همکاران (Li *et al*., 2022b) در مطالعه‌ای مشابه اعلام کردند که ژن *Gn1a* به‌طور قابل‌توجهی سبب افزایش تعداد سنبلچه در خوشه شده است. نتایج مطالعه یانگ و همکاران (Yang *et al*., 2020). نیز نشان داد که محصول ژن *Gn1a* اثر مثبتی در خصوصیات خوشه همچون طول خوشه بلندتر و طول دانه بزرگتر و تعداد دانه بیشتر در هر خوشه دارد.

به‌طور کلی نتایج مطالعه حاضر نشان داد که از نشانگرهای مولکولی مبتنی بر توالی ژن *Gn1a* می‌توان در برنامه‌های به‌نژادی به‌منظور بهره‌مندی از مزایای تعداد دانه زیاد در خوشه با کاهش زمان اصلاحی برای پیشبرد برنامه‌های توسعه سریع نسل‌ها استفاده کرد. هر چند تعدادی دیگر از نمونه‌های مورد بررسی نیز دارای تعداد دانه بالا بودند که نشان‌دهنده وجود ژن‌های دیگر موثر بر تعداد دانه در خوشه بود. با توجه به نتایج مشاهده شده، نشانگر عملکردی *Gn1a* مورداستفاده در این مطالعه می‌تواند به‌عنوان شاخصی کارآمد برای غربالگری جمعیت‌های در حال تفرق برای بهبود صفت تعداد دانه مورداستفاده قرار گیرد.

سپاسگزاری

از مسئول محترم آزمایشگاه بیوتکنولوژی مؤسسه تحقیقات برنج کشور، سرکار خانم مهندس جمالزاده، معاون محترم پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی شمال کشور جناب آقای دکتر صیقلانی و کارشناسان آزمایشگاه ژنومیکس پژوهشکده مذکور سرکار خانم مهندس جوادی و آقای مهندس پتکی در زمینه همکاری در اجرای این برنامه تشکر و قدردانی می‌شود.

References

Andersen, J.R. and Lübberstedt, T. (2003). Functional markers in plants. *Trends in Plant Science*, **8:** 554-560.

Ashikari, M., Sakakibara, H., Lin, S., Yamamoto, T., Takashi, T., Nishimura, A., Angeles, E.R., Qian, Q., Kitano, H. and Matsuoka, M. (2005). Cytokinin oxidase regulates rice grain production. *Science*, **309:** 741-745.

Doyle, J. and Doyle, J.L. (1990). Isolation of plant DNA from faesh tissue. *Focus*, **12:** 13-15.

Fernando, A., Selvaraj, M., Chavarriaga, P., Valdes, S. and Tohme, J. (2021). A clearinghouse for genome-edited crops and field testing. *Molecular Plant*, **14:** 3-5.

Gouda, G., Parida, M., Donde, R., Gupta, M.K., Kumar, J., Mohanty, S., Panda, R., Dash, S., Pradhan, S., Mohapatra, T. and Behera, L. (2019). Identification of high grain number genes and assessment of genetic diversity in high and low grain number rice genotypes useful for marker-assisted selection breeding programs. *Annals of Plant and Soil Research*, **21(4):** 301-311.

Gouda, G., Gupta, M.K., Donde, R., Kumar, J., Parida, M., Mohapatra, T., Dash, S.K., Pradhan, S.K. and Behera, L. (2020). Characterization of haplotypes and single nucleotide polymorphisms associated with Gn1a for high grain number formation in rice plant. *Genomics*, **112(3):** 2647-2657.

Halilu, Z., Rabi'u Aliyu Umar, R.A., Shehu, A.A,. Turaki, A.A., Balarabe, A.H. and Gumi, A.M. (2020). Studies on some major yield responsive genes in selected rice (*Oryza species*) cultivars grown in Nigeria using candidate gene SSR-based markers approach. *African Journal of Biotechnology*, **19:** 33-42.

Ikeda, M., Miura, K., Aya, K., Kitano, H. and Matsuoka, M. (2013). Genes offering the potential for designing yield-related traits in rice. *Current opinion in Plant Biology*, **16:** 213-220.

Huang, Y., Dong, H., Shang, M. and Wang, K. (2021). CRISPR/Cas systems: the link between functional genes and genetic improvement. *The Crop Journal*, **9(3):** 678-687.

Jiang, S., Sun, S., Bai, L., Ding, G., Wang, T., Xia, T., Jiang, H., Zhang, X. and Zhang, F. (2017). Resequencing and variation identification of whole genome of the japonica rice variety" Longdao24" with high yield. *PLoS One*, **12:** e0181037.

Kaab Omeyr, A., PourMohammadi, P., Gilani, A., Alami-Saeid, K. and Fakhari, M. (2022). Investigation of genetic diversity and classification of aerobic and local rice genotypes in Khuzestan province. *Plant Genetic Researches*, **8(2):**103-116 (In Persian).

Li, G., Xu, B., Zhang, Y., Xu, Y., Khan, N.U., Xie, J., Sun, X., Guo, H., Wu, Z.and Wang, X. (2022a). RGN1 controls grain number and shapes panicle architecture in rice. *Plant Biotechnology Journal*, **20:** 158-167.

Li, M., Pan, X. and Li, H. (2022b). Pyramiding of gn1a, gs3, and ipa1 exhibits complementary and additive effects on rice yield. *International Journal of Molecular Sciences*, **23:** 12478.

Liu, M., Fan, F., He, S., Guo, Y., Chen, G., Li, N., Li, N., Yuan, H., Si, F. and Yang, F. (2022). Creation of elite rice with high-yield, superior-quality and high resistance to brown planthopper based on molecular design. *Rice*, **15:** 1-13.

Liu, X., Zhou, S., Wang, W., Ye, Y., Zhao, Y., Xu, Q., Zhou, C., Tan, F., Cheng, S. and Zhou, D.X. (2015). Regulation of histone methylation and reprogramming of gene expression in the rice inflorescence meristem. *The Plant Cell*, **27:** 1428-1444.

Lübberstedt, T., Melchinger, A.E., Fähr, S., Klein, D., Dally, A. and Westhoff, P. (1998). QTL mapping in testcrosses of flint lines of maize: III. Comparison across populations for forage traits. *Crop Science*, **38:** 1278-1289.

Lübberstedt, T., Zein, I., Andersen, J.R., Wenzel, G., Krützfeldt, B., Eder, J., Ouzunova, M. and Chun, S. (2005). Development and application of functional markers in maize. *Euphytica*, **146:** 101-108.

Ma, F., Zhu, X., Wang, H., Wang, S., Cui, G., Zhang, T., Yang, Z., He, G., Ling, Y. and Wang, N. (2019). Identification of QTL for kernel number-related traits in a rice chromosome segment substitution line and fine mapping of qSP1. *The Crop Journal*, **7:** 494-503.

MirMohammadi Maibody, S.A.M. and Golkar, P. (2019). Application of DNA molecular markers in plant breeding *Plant Genetic Researches*, **6(1):**1-30 (In Persian).

Nellemann, C. (2009). *The Environmental Food Crisis: The Environment's Role In Averting Future Food Crises: A UNEP Rapid Response Assessment*. UNEP/Earthprint, United Nations Avenue, Gigiri Nairobi, KENY.

Nishimura, C., Ohashi, Y., Sato, S., Kato, T., Tabata, S. and Ueguchi, C. (2004). Histidine kinase homologs that act as cytokinin receptors possess overlapping functions in the regulation of shoot and root growth in Arabidopsis. *The Plant Cell*, **16:** 1365-1377.

Qian, Q., Guo, L., Smith, S.M. and Li, J. (2016). Breeding high-yield superior quality hybrid super rice by rational design. *National Science Review*, **3:** 283-294.

Riefler, M., Novak, O., Strnad, M. and SchmüLling, T. (2006). Arabidopsis cytokinin receptor mutants reveal functions in shoot growth, leaf senescence, seed size, germination, root development, and cytokinin metabolism. *The Plant Cell*, **18:** 40-54.

Salami, H. and Bastani, M. (2017). Is rice import unjustified in Iran?. *Journal of Agricultural Economics and Development*, **31(3):** 268-278 (In Persian).

Sharifi, P. and Aminpanah, H. (2017). Evaluation of genotype × environment interactions, stability and a number of genetic parameters in rice genotypes. *Plant Genetic Researches*, **3(2):** 25-42 (In Persian).

Shen, L., Wang, C., Fu, Y., Wang, J., Liu, Q., Zhang, X., Yan, C., Qian, Q. and Wang, K (2018). QTL editing confers opposing yield performance in different rice varieties. *Journal of Integrative Plant Biology*, **60:** 89-93.

Varshney, R.K., Singh, V.K., Kumar, A., Powell, W. and Sorrells, M.E. (2018). Can genomics deliver climate-change ready crops? *Current Opinion in Plant Biology*, **45:** 205-211.

Xu, Z., Miao, Y., Chen, Z., Gao, H., Wang, R., Zhao, D., Zhang, B., Zhou, Y., Tang, S. and Zhang, H. (2019). Identification and fine mapping of qGN1c, a QTL for grain number per panicle, in rice (*Oryza sativa*). *Molecular Breeding*, **39:** 1-12.

Yan, C.J., Yan, S., Yang, Y.C., Zeng, X.H., Fang, Y.W., Zeng, S.Y., Tian, C.Y., Sun, Y.W., Tang, S.Z. and Gu, M.H. (2009). Development of gene-tagged markers for quantitative trait loci underlying rice yield components. *Euphytica*, **169:** 215-226.

Yang, Y., Shen, Z., Xu, C., Guo, M., Li, Y., Zhang, Y., Zhong, C., Sun, S. and. Yan, C. (2020). Genetic improvement of panicle-erectness japonica rice toward both yield and eating and cooking quality. *Molecular Breeding*, **40:** 1-12.

Zeng, D., Tian, Z., Rao, Y., Dong, G., Yang, Y., Huang, L., Leng, Y., Xu, J., Sun, C., Zhang, G. and Hu, J. (2017). Rational design of high-yield and superior-quality rice. *Nature plants*, **3(4):** 1-5.

Zhang, G.H., Li, S.Y., Wang, L., Ye, W.J., Zeng, D.L., Rao, Y.C., Peng, Y.L., Hu, J., Yang, Y.L., Xu, J. Ren, D.Y., Gao, Z.Y., Zhu, L., Dong, G.J., Hu, X.M., Yan, M.X., Guo, L.B. , Li, C.Y. and Qian, Q. (2014). LSCHL4 from japonica cultivar, which is allelic to NAL1, increases yield of indica super rice 93-11. *Molecular Plant*, **7:** 1350-1364.