

شناسایی آلل‌های حاوی اطلاعات در کنترل صفات برنج تحت شرایط غرقاب و تنش خشکی

حال بی‌بی بادیردست^۱، سید یحیی صالحی لیسار^۲، حسین صبوری^{۳*}، علی موافقی^۴ و ابراهیم غلامعلی پور علمداری^۵

۱- دانشجوی دکتری، گروه علوم گیاهی، دانشکده علوم طبیعی، دانشگاه تبریز، تبریز

۲- دانشیار، گروه علوم گیاهی، دانشکده علوم طبیعی، دانشگاه تبریز، تبریز

۳- دانشیار گروه تولیدات گیاهی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه گنبد کاووس، گنبد کاووس

۴- استاد، گروه علوم گیاهی، دانشکده علوم طبیعی، دانشگاه تبریز، تبریز

۵- استادیار، گروه تولیدات گیاهی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه گنبد کاووس، گنبد کاووس

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۰۸/۱۰ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۰۱/۲۱)

چکیده

تعیین رابطه بین ژنوتیپ و فنوتیپ یکی از اهداف اصلی پروژه‌های به‌نژادی است. امروزه نشانگرهای مولکولی ابزارهای قدرتمندی برای ارزیابی این ارتباط در اختیار به‌نژادگران قرار می‌دهند. در این بررسی تنوع ژنتیکی ۱۱۲ لاین برنج با استفاده از ۲۰ جفت نشانگر ریزماهواره پیوسته با آلل‌های تحمل به خشکی مورد بررسی قرار گرفت که در مجموع ۷۷ آلل چند شکل با میانگین ۳/۸۵ آلل به ازای هر جفت آغازگر تکثیر شد. کم‌ترین تعداد آلل مربوط به نشانگرهای RM28199 و RM212 با ۲ آلل و بیشترین آن مربوط به نشانگر RM72 با ۶ آلل بود. میزان اطلاعات چندشکلی برای نشانگرهای مورد بررسی بین ۰/۳۰ تا ۰/۷۲ با میانگین ۰/۵۸ بود که بیشترین مقدار مربوط به نشانگر RM85 و RM20A و کم‌ترین آن مربوط به نشانگر RM28099 بود. از نظر تنوع ژنی، نشانگرهای RM28099 و RM85 به ترتیب کم‌ترین (۰/۳۳) و بیشترین (۰/۷۶) تنوع را داشتند. نتایج تجزیه رگرسیون گام‌به‌گام داده‌های ریزماهواره و صفات مورفولوژیک در شرایط غرقاب ۶۲ آلل و در شرایط تنش خشکی ۵۴ آلل آگاهی‌بخش را برای صفات ارزیابی‌شده، شناسایی نمود. تجزیه خوشه‌ای بر اساس داده‌های مولکولی ژنوتیپ‌ها را به ۷ گروه تقسیم نمود. با توجه به توزیع مناسب DNA تکثیرشده توسط نشانگرهای مورد بررسی در این تحقیق، از نشانگرهایی که قدرت تفکیک و پیوستگی بالایی با صفات مهم زراعی در شرایط تنش خشکی دارند (و در صورتی که در آزمایش‌های بعدی به تأیید برسند)، می‌توان در برنامه‌های به‌نژادی تنش خشکی استفاده نمود.

واژگان کلیدی: برنج، تجزیه خوشه‌ای، تنش خشکی، تنوع ژنتیکی، نشانگر ریزماهواره

* نویسنده مسئول، آدرس پست الکترونیکی: hossein.sabouri@gonbad.ac.ir

مقدمه

برنج یکی از مهم‌ترین گیاهان زراعی جهان و تأمین‌کننده کربوهیدرات‌های کثیری از مردم جهان است که سطح وسیعی از زمین‌های زیر کشت در آسیا را به خود اختصاص داده است؛ به‌گونه‌ای که بیش از ۹۰ درصد برنج در آسیا تولید و مصرف می‌گردد (Yashitol *et al.*, 2004). خشکی یکی از تنش‌های محیطی است که بر اکثر مراحل رشد برنج، ساختار و فعالیت اندام‌های این گیاه اثرات زیان‌بار وارد می‌سازد و موجب کاهش عملکرد و تولید این گیاه می‌گردد (Salehi Lisar and Bakhshayeshan Agdam, 2017; Zali *et al.*, 2016; Shayan *et al.*, 2016). پیدا کردن مکان‌های ژنی مؤثر و ژنوتیپ‌هایی با ذخایر ژنی متنوع در جهت بهبود عملکرد گیاهان در شرایط تنش خشکی یکی از اهداف دانشمندان در عرصه‌های مختلف علوم گیاهی است (Park *et al.*, 2014). از میان حدود ۳۰۰۰۰ گونه گیاهی خوراکی شناسایی شده تنها ۳۰ گونه منابع عمده تغذیه مردم جهان را تشکیل می‌دهند. علاوه بر کاهش تنوع بین‌گونه‌ای در گیاهان زراعی، اصلاح گیاهان از طریق ایجاد جمعیت‌های اصلاح‌شده دارای سازگاری بالا، انتخاب بهترین ژنوتیپ‌ها، ایجاد ارقام محلی یکنواخت و ترویج واریته‌های سازگار باعث کاهش تنوع داخل گونه‌ای شده است (Amini Nasab *et al.*, 2012; Haussmann *et al.*, 2004). کسب اطلاع از فاصله‌ی ژنتیکی نسبی موجود در بین افراد یا جمعیت‌ها در برنامه‌های اصلاحی اهمیت ویژه‌ای دارد، زیرا امکان سازمان‌دهی ژرم‌پلاس و نمونه‌گیری ژنوتیپ به‌طور مؤثرتر فراهم می‌شود. امروزه جهت تعیین تنوع ژنتیکی بین جمعیت‌های حفاظت‌شده علاوه بر شیوه‌های سنتی (مبتنی بر خصوصیات و نشانگرهای مورفولوژی و فیلوژنیک) از ابزارها و نشانگرهای نوین مولکولی از جمله نشانگرهای DNA استفاده می‌شود (Azizi *et al.*, 2017; Jedari Kouhi *et al.*, 2011; Amiri *et al.*, 2017). در صورتی‌که بتوان نشانگرهای پیوسته با عوامل ژنتیکی کنترل‌کننده صفات کمی را تشخیص داد، امکان گزینش در نسل‌های در حال تفکیک تسهیل و تسریع شده و

کارایی گزینش و پیشرفت ژنتیکی حاصل از گزینش افزایش می‌یابد. به علت توانایی بالای ریزماهوره در نشان دادن چندشکلی، توارث هم بارز و فراوانی نسبی در ژنوم، از این نشانگرها برای آنالیزهای ژنتیکی استفاده می‌شود. نشانگرهای ریزماهوره این امکان را به وجود می‌آورند که آل‌های نمونه‌های مختلف به‌طور مستقیم مورد مقایسه قرار گیرند و به نتایج سایر گروه‌های تحقیقاتی ارتباط داده شوند. درمجموع شناسایی و آنالیز آل‌های ریزماهوره به دلیل طبیعت آسان هم بارز آن‌ها سودمند است (Azizi *et al.*, 2017; Nikzade Talebi *et al.*, 2016). با وجود این‌که تعداد زیادی از این توالی‌ها گزارش شده است، اما هنوز مطالعات در این زمینه تکمیل نشده است (Jahani *et al.*, 2013; Ghiasy *et al.*, 2016). در آزمایشی با استفاده از ۱۷ نشانگر ریزماهوره در ۲۲ ژنوتیپ برنج مشخص شد که ۸ نشانگر (RM530-A, RM24627-A, RM24669-C, RM684-A, RM160-A, RM24627-A, RM684-A, RM6535-C) دارای ارتباط معنی‌داری با خصوصیات مورفولوژیک ریشه در طی تنش خشکی هستند (Tavala *et al.*, 2015). در طی ارزیابی ژنوتیپی با استفاده از ۲۶ جفت آغازگر ریزماهوره بر روی ۵۳ ژنوتیپ، برنج نشانگرهای RM11943, RM104, RM190, RM28166, RM231, RM510, RM270, RM431 و RM19367 به‌عنوان نشانگرهای مرتبط با چندین صفت جوانه‌زنی در برنج معرفی گردیدند (Raiesi and Sabouri, 2015). در بررسی تجزیه ارتباط صفات پیش از جوانه‌زنی ۳۴ ژنوتیپ برنج بومی و اصلاح‌شده با ۲۰ نشانگر ریزماهوره، بالاترین ضریب تبیین (۴۷ درصد) متعلق به چهار نشانگر RM282, RM220, RM447 و RM320 برای صفت شکل دانه بود. برای صفات درصد جوانه‌زنی پیش از برداشت و درصد جوانه‌زنی پیش از برداشت برحسب دانه پر نیز یک نشانگر مشترک RM525 به ترتیب ۹ و ۱۴ درصد از تغییرات این دو صفت را توجیه نمود. برای صفات فراوانی دانه جوانه‌زده در طول خوشه و میزان فعالیت آلفا آمیلاز نیز به‌طور مشترک نشانگرهای RM525, RM447 و RM124 به ترتیب ۳۱ و

گردد. فاصله بین کرت‌ها ۰/۵ متر و فاصله بین بلوک‌ها یک متر بود. از ۴۹ بوته موجود، بعد از رسیدگی کامل ۱۰ بوته از هر لاین با رعایت اثر حاشیه برداشت شد. برای اندازه‌گیری صفات به آزمایشگاه منتقل گردید و صفات مورفولوژیک از جمله؛ تعداد روز از کشت تا گلدهی و رسیدگی، بیوماس، ارتفاع گیاه، تعداد پنجه بارور، تعداد پنجه کل، طول و عرض برگ پرچم، طول خروج از غلاف، قطر ساقه، طول خوشه اصلی، وزن کل خوشه‌ها، وزن خوشه اصلی، وزن کل ساقه، وزن دانه‌های پر، وزن دانه‌های پوک، تعداد دانه پر، تعداد دانه پوک، تعداد خوشه چه اولیه، تعداد خوشه چه ثانویه بر اساس دستورالعمل استاندارد ارزیابی صفات برنج (SES, 2013) اندازه‌گیری و ثبت گردیدند. برای محاسبه عملکرد دانه نیز از یک متر مربع برداشت شد و دانه‌های برداشت شده وزن گردید. ارزیابی‌های مولکولی: از برگ‌های تازه و جوان ژنوتیپ‌ها، نمونه‌های برگ‌ها به منظور استخراج DNA به روش CTAB تهیه شد (Saghai Mroof *et al.*, 1994). پس از استخراج DNA، کیفیت و کمیت تقریبی آن به وسیله ژل آگارز ۰/۸ درصد تعیین شد. این آزمایش با استفاده از ۲۰ جفت آغازگر ریزماهواره پیوسته به QTL‌های تحمل به خشکی ژنوم گیاه برنج انجام شد. این نشانگرها طبق مطالعات پیشین با استفاده از جمعیت‌ها و زمینه‌های ژنتیکی متعدد پیوسته با QTL‌های مرتبط با تنش خشکی در گیاه برنج شناسایی شدند (Vikram *et al.*, 2011; Miah *et al.*, 2013; Vikram *et al.*, 2016; Anandan *et al.*, 2016; Awasthi and Lal, 2014; Mishra *et al.*, 2013). برای انتخاب این نشانگرها از مقالات و سایت معتبر گرامینه (www.gramene.org) استفاده شد (جدول ۳). واکنش در حجم حدود ۱۰ میکرولیتر، با اجزای ۲ میکرولیتر DNA، ۱ میکرو لیتر از بافر PCR(10X)، ۰/۴ میکرو لیتر از هر آغازگر با غلظت ۶۰ نانوگرم در میکرولیتر، ۰/۶ میکرو لیتر مخلوط dNTP (۲ میلی مو لار)، ۰/۱۲ میکرو لیتر آنزیم Taq polymerase DNA (۵ واحد در میکرو لیتر) و ۵ میکرو لیتر آب دیونیزه شده انجام شد. واکنش PCR به صورت تاج داوون و توسط دستگاه ترموسایکلر Bio RAD (ساخت کشور آمریکا) صورت گرفت.

۲۸ درصد ارتباط را به خود اختصاص دادند (Nikzade Talebi *et al.*, 2016).

هدف از این تحقیق شناسایی آلل‌های حاوی اطلاعات مثبت در کنترل صفات برنج تحت شرایط غرقاب و تنش خشکی بود تا از این طریق نشانگرهای مرتبط با صفات مورفولوژیک برای استفاده در برنامه‌های به‌نژادی شناسایی شوند.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی این بررسی ۱۱۲ لاین برنج تهیه‌شده از موسسه بین‌المللی تحقیقات برنج (International Rice Research Institute) در قالب طرح بین‌المللی مشترک بین آن موسسه و دانشگاه گنبد کاووس بود (جدول ۱). جهت ارزیابی‌های فنوتیپی، لاین‌ها در دو آزمایش جداگانه در قالب طرح لاتیس در دو شرایط نرمال و تنش خشکی در سه تکرار ارزیابی شد. ابتدا لاین‌ها در گلدان کشت شدند و بعد به زمین اصلی منتقل شدند و نشاکاری انجام شد. به منظور ارزیابی خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک، نمونه‌گیری از خاک مزرعه انجام شد و به آزمایشگاه خاک‌شناسی شهرستان کلالة منتقل گردید (جدول ۲). هر کدام از ۱۱۲ لاین با فاصله بین و روی ردیف ۲۵ سانتیمتر در مساحت دو متر و ۲۵ سانتی‌متر مترمربع کشت شدند. آبیاری در شرایط بدون تنش به صورت غرقاب در طول دوره رشد ژنوتیپ‌ها انجام شد، اما در محیط تنش آبیاری مزرعه از ۴۰ روز پس از نشاکاری (مرحله با حداکثر پنجه‌زنی) به منظور اعمال تنش قطع شد و بعد از ۴۰ روز به فاصله ۱۵ روز آبیاری انجام شد، پس از ۱۵ روز از خاک مزرعه نمونه‌برداری شد و وزن خشک و تر آن و رطوبت وزنی آن اندازه‌گیری شد و با توجه به منحنی رطوبتی خاک مزرعه بر حسب بار تخمین زده شد که در مرحله اول (۵۵ روز بعد از نشا) پتانسیل آب خاک مزرعه ۱۵- بار و در مرحله دوم (۷۰ روز بعد از نشا) پتانسیل آب خاک ۲۵- بار بود. برای جلوگیری از نفوذ آب از حاشیه مزرعه، فاصله بین آزمایش‌ها دو متر در نظر گرفته شد و پوشش پلاستیکی تا عمق یک متری خاک فرو برده شد تا مانع از نفوذ آب

جدول ۱- شماره و نام ژنوتیپ‌های ارزیابی‌شده در این مطالعه

Table 1. Number and name of evaluated genotypes in this study

شماره	نام ژنوتیپ	منشأ	شماره	نام ژنوتیپ	منشأ	شماره	نام ژنوتیپ	منشأ	شماره	نام ژنوتیپ	منشأ
No.	genotype Name	Origin	No.	Genotype name	Origin	No.	Genotype name	Origin	No.	Genotype name	Origin
1	BP 12600F-KN-4-1	Indonesia	34	HHZ 1-DT3-Y1-Y1	IRRI	67	IR12L357	IRRI	100	IR 11A506	IRRI
2	BP 12816F-KN-7-1	Indonesia	35	HHZ 1-DT4-LI1-LI1	IRRI	68	IR12L369	IRRI	101	IR 11A511	IRRI
3	BP 16732E-6	Indonesia	36	HHZ 1-DT7-LI2-LI1	IRRI	69	IR13L114	IRRI	102	IR 11N121	IRRI
4	HHZ 10-DT7-Y1	IRRI	37	HHZ 21-SAL13-Y1-Y1	IRRI	70	IR13L118	IRRI	103	IR 11N169	IRRI
5	HHZ 14-SAL13-LI2-DT1	IRRI	38	HHZ 21-Y4-Y2-Y1	IRRI	71	IR13L137	IRRI	104	IR 11N313	IRRI
6	HHZ 1-DT3-Y1-Y1	IRRI	39	HHZ 2-SUB2-DT1-DT1	IRRI	72	IR13L397	IRRI	105	IR12L201	IRRI
7	GhNa-3	IRAN	40	HHZ 3-SAL13-Y1-SAL1	IRRI	73	IR13L400	IRRI	106	SAKHA 105	EGYPT
8	IR 64683-87-2-2-3-3 (PSB RC 82)	Philippines	41	HHZ 3-SAL6-Y1-Y1	IRRI	74	IR13L406	IRRI	107	IR 11C123	IRRI
9	HHZ 10-DT5-LI1-LI1	IRRI	42	HHZ 4-DT3-Y1-Y1	IRRI	75	IR13L413	IRRI	108	IR 11C186	IRRI
10	HHZ 15-SAL13-Y1	IRRI	43	HHZ 4-DT6-LI2-LI1	IRRI	76	IR14L177	IRRI	109	IR 11C228	IRRI
11	HHZ 15-SAL13-Y3	IRRI	44	HHZ 6-DT1-LI1-LI1	IRRI	77	IR14L238	IRRI	110	HHZ-5-DT20-DT2-DT1	IRRI
12	HHZ 18-Y3-Y1-Y1	IRRI	45	IR14L116	IRRI	78	IR14L240	IRRI	111	Firooz (Acc 39261)	IRAN
13	HHZ 1-DT3-Y1-Y1	IRRI	46	IR14L101	IRRI	79	IR 43	IRRI	112	IR64197-3B-15-2	IRRI
14	HHZ 1-DT7-LI2-LI1	IRRI	47	IR14L103	IRRI	80	IR14T111	IRRI			
15	HHZ 21-DT7-Y1-Y1	IRRI	48	IR13L188	IRRI	81	IR14T129	IRRI			
16	HHZ 21-SAL13-Y1-Y1	IRRI	49	IR14L247	IRRI	82	IR12T246	IRRI			
17	HHZ 21-Y4-Y2-Y1	IRRI	50	IR14L260	IRRI	83	IR11T257	IRRI			
18	HHZ 22-Y3-DT1-Y1	IRRI	51	IR14L256	IRRI	84	IR 28	IRRI			
19	HHZ 23-DT16-DT1-DT1	IRRI	52	IR14L248	IRRI	85	IR71896-3R-8-3-1	IRRI			
20	HHZ 26-SAL12-Y1-Y1	IRRI	53	IR14L121	IRRI	86	IRBL7-M[CO]	IRRI			
21	HHZ 2-SUB2-DT1-DT1	IRRI	54	IR14L153	IRRI	87	IRBLZT-IR56[CO]	IRRI			
22	HHZ 3-SAL13-Y2-DT1	IRRI	55	IR14L160	IRRI	88	IR06A145	IRRI			
23	HHZ 3-SAL4-Y1-Y1	IRRI	56	IR14L137	IRRI	89	IR 09L204	IRRI			
24	HHZ 4-SAL5-Y2-Y1	IRRI	57	IR13L268	IRRI	90	IR08L216	IRRI			
25	HHZ 6-DT1-LI1-LI1	IRRI	58	IR12L380	IRRI	91	IR09N516	IRRI			
26	IRRI 104	IRRI	59	IR14L262	IRRI	92	IR 09N251	IRRI			
27	IRRI 154	IRRI	60	IR14L271	IRRI	93	IR 10A227	IRRI			
28	HHZ 10-DT5-LI1-LI1	IRRI	61	IR14L270	IRRI	94	IR10A121	IRRI			
29	HHZ 10-DT8-DT1-DT1	IRRI	62	IR13F228	IRRI	95	IR 10A199	IRRI			
30	HHZ 15-DT7-SAL2	IRRI	63	IR13F321	IRRI	96	IR 10A237	IRRI			
31	HHZ 15-SAL13-Y1	IRRI	64	IR13F589	IRRI	97	IR 10A314	IRRI			
32	HHZ 15-SAL13-Y3	IRRI	65	IRRI 132	IRRI	98	IR 11A479	IRRI			
33	HHZ 18-Y3-Y1-Y1	IRRI	66	B11598C-TB-2-1-B-7	INDONESIA	99	IR 11A501	IRRI			

جدول ۲- خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک محل آزمایش

Table 2. Physical and chemical properties of soil at the test site

مقدار (Content)	Characteristic	مشخصه
2	Electric conductivity (dc Siemens/m)	هدایت الکتریکی (دسی زیمنس بر متر)
7.6	pH	pH
10.5	Neutralizing agents (percent)	مواد خنثی شونده (درصد)
0.84	Organic carbon (percent)	کربن آلی (درصد)
0.08	Total nitrogen (percent)	نیتروژن کل (درصد)
16.4	absorbable Phosphorus (ppm)	فسفر قابل جذب (قسمت در میلیون)
195	absorbable potassium (ppm)	پتاسیم قابل جذب (قسمت در میلیون)
35	Si (percent)	سیلت (درصد)
54	C (percent)	رس (درصد)
11	L (percent)	لوم
48.5	Saturated moisture percent	رطوبت اشباع (درصد)
4	Fe	آهن
17.8	Mn	منگنز
0.7	Zn	روی
2	Cu	مس

جدول ۳- ویژگی نشانگرهای مورد استفاده در این مطالعه

Table 3. Characteristics of the markers used in this study

نشانگر Marker	آغازگر رو به جلو Forward primer 5'-3'	آغازگر معکوس Reverse primer 5'-3'	شماره کروموزوم Chr. No.
RM28048	TTCAGCCGATCCATTCAATTCC	GCTATTGGCCGAAAGTAGTTAGC	12
RM28099	TGTGCGGATGCGGGTAAGTCC	CCACCTGTCAACCACCGAAACC	12
RM511	AACGAAAGCGAAGCTGTCTCC	ATTTGTTCCCTTCCTTCGATCC	12
RM28166	TGCTTGCAAACATTGCTTCTGG	ACTGATGTACTGAACACGGGAAGG	12
RM28199	CGGCTTAGGGAGCGTCTGTAGG	GCATGCTAGTATGGCCACCATATTCC	12
RM315	AAGCTCATTTGAGGGTATCG	AGGGCAAGAGAAACTATTGG	1
RM11943	CTTGTTTCGAGGACGAAGATAGGG	CCAGTTTACCAGGGTCGAAACC	1
RM8134, RM431	GCTTGCTTGTATCTGCATTGGTAGG	GGGATGATCCACTCTCTGTTTGG	1
RM12023	TGCGTACCTCTGCTCCTCTCTGC	GACGAAGCCGACCAAGTGAAGC	1
RM212	AAGGTCAAGGAAACAGGGACTGG	AGCCACGAATTCCACTTTCAGC	1
RM256	GACAGGGAGTGATTGAAGGC	GTTGATTTCGCCAAGGGC	2
RM149	GCTGACCAACGAACCTAGGCCG	GTTGGAAGCCTTTCCTCGTAACACG	8
RM8085	CCTCGTCCTCCTCGTCATCG	AGCAGCGAAATGGAAGGAACC	1
RM3825	CCACTAGCAGATGATCACAGACG	GAGCACCTCATAAGGGTTTCAGC	1
RM72	CCGGCGATAAAACAATGAG	GCATCGGTCCTAATAAGGG	8
RM5414, RM518	AAGACACAAGCAAACAGCTCAACC	AAGCTTGCTTGGTTCAAGAGAGG	4
RM228	CTGGCCATTAGTCCTTGG	GCTTGCGGCTCTGCTTAC	10
RM20A	TGTATGCACAGCTGCTCTACTCC	GCACGACCAGAAATTAACAAGG	12
RM85	CCAAAGATGAAACCTGGATTG	GCACAAGGTGAGCAGTCC	8
RM341	CAAGAAACCTCAATCCGAGC	CTCCTCCCGATCCCAATC	2

به دنبال آن ۲۶ چرخه شامل ۴۵ ثانیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، ۴۵ ثانیه در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد و یک دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد بود. پس از اتمام ۲۶ چرخه فوق، نمونه‌ها به منظور انجام بسط نهایی پنج دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. سپس فرآورده‌های PCR با استفاده از الکتروفورز ژل پلی‌آکریل

چرخه حرارتی شامل یک چرخه واسرشت اولیه برای DNA الگو در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴ دقیقه و به دنبال آن ۱۰ چرخه شامل ۴۵ ثانیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، ۴۵ ثانیه در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد (با کاهش هر یک درجه سانتی‌گراد در هر چرخه تا رسیدن به دمای اتصال) و یک دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد و

آمید ۶ درصد تفکیک و به روش نیترا نقره رنگ‌آمیزی شدند (Switzer *et al.*, 1979). در نهایت امتیازدهی نوارها انجام گرفت. به منظور تجزیه و تحلیل داده‌های مولکولی و به دست آوردن اطلاعات مربوط به تنوع نشانگرهای ریزماهواره از نرم‌افزار pope gene، برای تجزیه به مؤلفه‌های اصلی از نرم‌افزار past و رسم نمودار درختی و سایر اطلاعات تنوع ژنتیکی از نرم‌افزار power marker استفاده شد. شاخص اطلاعات چندشکلی آغازگر از طریق فرمول $PIC = \sum (1 - p_i^2)/n$ محاسبه شد که p_i فراوانی آل i و n تعداد کل ژنوتیپ‌هاست. به منظور شناسایی نشانگرهای دارای اطلاعات مؤثر از تجزیه رگرسیون چندگانه به روش گام‌به‌گام برای صفات مورفولوژیک به کمک نرم‌افزار SPSS Ver. 20 انجام شد. به‌طوری‌که در هر بار انجام تجزیه یکی از صفات مورفولوژیک به‌عنوان متغیر وابسته (Y) و کلیه نشانگرها به‌عنوان متغیرهای مستقل (X) در تجزیه وارد شدند.

نظر به جلوگیری از اشتباه نوع اول برای نشانگرهای معنی دار مشاهده شده تصحیح بونفرونی انجام شد. برای این منظور p value مرتبط با نشانگرهای مرتبط در برابر مقدار بحرانی معنی دار بونفرونی آزمون شد. بنابراین دو مقدار (۰/۰۵ و ۰/۰۱) بر تعداد نشانگر آل تکثیر شده تقسیم شد (جمالی و همکاران، ۲۰۱۷).

نتایج و بحث

سودمندی نشانگرهای ریزماهواره: بیست جفت آغازگر مورداستفاده الگوهای نواری مناسب و قابل امتیازدهی تولید کردند (جدول ۴). در مجموع ۷۷ آل در ژنوتیپ‌های مورد ارزیابی با میانگین ۳/۸۵ آل به ازای هر نشانگر تکثیر شدند. نشانگر RM72 با ۶ آل بیشترین و نشانگرهای RM28199 و RM212 با ۲ آل کم‌ترین تعداد آل را تولید نمودند. در طی بررسی ۳۲ ژنوتیپ برنج با استفاده از ۱۹ نشانگر ریزماهواره نشان داده شد که ۱۵ نشانگر چند شکل بود و تعداد قطعات تکثیرشده به ازای هر نشانگر ۶ نوار بود (Valizadeh Soumeh *et al.*, 2014). فراوانی آل شایع (آلی که در بین آل‌های مشاهده‌شده برای یک نشانگر، بیشترین فراوانی را در بین ژنوتیپ‌های

موردبررسی دارد)، از ۰/۲۹ در RM431 تا ۰/۸۱ در RM28099 با میانگین ۰/۴۸ متغیر بود. بیشترین فراوانی آل شایع مربوط به نشانگر RM28099 و کم‌ترین آن مربوط به نشانگر RM431 بود. عقیده بر این است که بقیه آل‌ها از آل شایع منشأ گرفته‌اند. تنوع ژنی یا هتروزیگوتی مورد انتظار که احتمال متفاوت بودن دو آل تصادفی از دو فرد را نشان می‌دهد، بین ۰/۳۳ تا ۰/۷۶ متغیر بود. بیشترین میزان تنوع ژنی به نشانگر RM85 و کم‌ترین آن مربوط به RM28099 بود. مقادیر بالای تنوع ژنی توانایی نشانگرها را در تمایز ژنوتیپ‌ها نشان می‌دهد (Matus and Hayes, 2002). میزان اطلاعات چندشکلی در مجموع نشانگرهای مورداستفاده در محدوده ۰/۳۰ تا ۰/۷۲ با میانگین ۰/۵۸ قرار داشت. بیشترین میزان PIC به نشانگرهای RM85 و RM20A و کم‌ترین میزان آن به نشانگر RM28099 اختصاص داشت. می‌توان گفت که نشانگر RM85 و RM20A قدرت تمایز بالایی را در این گروه از ژنوتیپ‌ها داشتند. در بررسی که با استفاده از ۲۰ جفت نشانگر ریزماهواره بر ۷۰ ژنوتیپ *Aegilops crassa* بومی ایران انجام شد، نشانگر GWM161 بیشترین مقدار PIC (۰/۴۴) و نشانگر GWM190 کم‌ترین PIC (۰/۱۶) را نشان دادند (Ranjbar *et al.*, 2009). میزان اطلاعات چندشکلی، یکی از پارامترهای مهم جهت مقایسه نشانگرها از لحاظ قدرت تمایز آن‌ها است. مقادیر بالای این معیار دلالت بر چندشکلی زیاد و وجود آل یا آل‌های نادر در یک جایگاه نشانگری است و بیانگر قدرت تفکیک و تمایز بالای آن نشانگر است (Ribeiro-Carvalho *et al.*, 2004). همان‌گونه که ملاحظه می‌گردد نشانگرهایی که میزان اطلاعات چندشکلی بالایی داشتند، تنوع ژنی بالایی نیز دارا بودند که این امر نشان‌دهنده همبستگی بین PIC و تنوع ژنی است. در بررسی که با استفاده از ۲۰ نشانگر ریزماهواره بر روی ۳۴ رقم بومی و اصلاح‌شده برنج انجام

همان‌گونه که انتظار می‌رفت مؤلفه اول بیشترین میزان تغییرات را توجیه نمود. در اطلاعات حاصل از نشانگرهای مولکولی، کم بودن درصد تبیین تغییرات مولکولی در تجزیه‌های چندمتغیره مثل تجزیه به مؤلفه‌های اصلی اول، بر مستقل بودن مکان‌ها و نشانگرهای مورد مطالعه و توزیع مناسب آن‌ها در نواحی مختلف ژنوم دلالت دارد. در صورتی‌که نشانگرها از بخش‌های مختلف ژنوم انتخاب شده باشند، پیوستگی بین آن‌ها کم خواهد بود و در نتیجه تعداد بیشتری مؤلفه برای توجیه کل تغییرات لازم است. توزیع مناسب نشانگرها در سراسر ژنوم به معنی سنجش دقیق‌تر و بهتر تنوع مولکولی به دلیل نمونه‌برداری مناسب از کل ژنوم است (Aalami and Karami, 2016; Fazeli and Cheghamirza, 2011; Mohammadi and Prasanna, 2003)؛ بنابراین نتایج تجزیه به مختصات اصلی در این بررسی نشان داد که نشانگرهای موردبررسی در این مطالعه در نواحی مختلف ژنوم پراکنده هستند.

شد، میانگین شاخص تنوع در جمعیت مورد بررسی ۲/۹۵ بود که بیشترین و کم‌ترین آن به ترتیب مربوط به نشانگر RM104 (۵/۵۶) و RM282 (۱/۰۶) بود. در بررسی این محققین نشانگر RM104 با مقدار ۰/۸۱ بیشترین و RM282 با ۰/۱۰ کم‌ترین مقدار PIC را به خود اختصاص دادند و میانگین این شاخص نیز ۰/۵۹ برآورد گردید (Nikzade Talebi et al., 2016).

تجزیه به مؤلفه‌های اصلی: به‌منظور تعیین میزان همبستگی بین صفات و توجیه مقادیر واریانس متغیرهای اولیه چند مؤلفه اصلی اول، تجزیه به مؤلفه‌های اصلی انجام شد. ده مؤلفه اول ۴۳/۶۰ درصد تغییرات را توجیه نمودند. اولین مؤلفه ۶/۶۶ درصد تغییرات را توجیه نمود. دومین مؤلفه ۶/۲۵ درصد از تغییراتی را که توسط مؤلفه اول توجیه نشده بود را توجیه کرد و به همین ترتیب روند توجیه تغییرات ادامه می‌یابد تا اینکه مؤلفه دهم ۳/۲۰ درصد از تغییراتی را که توسط ۹ مؤلفه قبل توجیه نشده را توجیه کرد (جدول ۵ و شکل ۱). در تجزیه به مؤلفه‌های اصلی

جدول ۴- اطلاعات مربوط به چندشکلی نشانگرهای ریزماهواره در این بررسی

Table 4. Polymorphic information of SSR markers used in this study

نشانگر Marker	فراوانی آل شایع Major allele frequency	تعداد آل چند شکل No. of polymorphic allele	تنوع ژنی Gene diversity	میزان اطلاعات چندشکلی Polymorphic information content (PIC)
RM28048	0.517	4	0.593	0.515
RM28099	0.806	3	0.329	0.301
RM511	0.648	3	0.482	0.400
RM28166	0.469	3	0.639	0.567
RM28199	0.523	2	0.499	0.374
RM315	0.367	4	0.721	0.671
RM11943	0.592	4	0.589	0.545
RM431	0.295	4	0.746	0.698
RM12023	0.444	3	0.648	0.575
RM212	0.571	2	0.490	0.370
RM302	0.486	4	0.659	0.604
RM149	0.400	4	0.684	0.624
RM8085	0.535	4	0.633	0.583
RM3825	0.480	4	0.661	0.605
RM72	0.466	6	0.692	0.648
RM518	0.448	4	0.693	0.644
RM228	0.405	5	0.725	0.681
RM20A	0.372	5	0.749	0.709
RM85	0.350	5	0.756	0.717
RM341	0.341	4	0.721	0.668
میانگین Means	0.476	3.85	0.635	0.575

جدول ۵- اطلاعات مربوط به ۱۰ مؤلفه اول در ژنوتیپ‌های برنج مورد ارزیابی

Table 5. Information of the 10 first components in rice genotypes

میزان کل	درصد واریانس	مقدار ویژه	مؤلفه اصلی
Total	Percent	Eigenvalue	Axis
6.660	6.658	3.001	1
12.890	6.242	2.814	2
17.740	4.854	2.188	3
22.120	4.377	1.973	4
26.210	4.094	1.846	5
30.000	3.794	1.710	6
33.770	3.767	1.698	7
37.200	3.429	1.546	8
40.410	3.210	1.447	9
43.600	3.180	1.434	10

تجزیه ارتباط: تجزیه رگرسیون داده‌های ریزماهواره و صفات مورفولوژیکی در مجموع در شرایط بدون تنش و تنش خشکی به ترتیب ۶۲ و ۵۴ آلل آگاهی‌بخش برای ۲۲ صفت ارزیابی‌شده شناسایی نمود. در شرایط بدون تنش صفات عرض برگ پرچم، قطر ساقه و وزن دانه پر بیشترین آلل مثبت را داشتند. در شرایط تنش خشکی صفات عملکرد دانه، وزن خوشه اصلی، بیوماس، وزن دانه پر و روز تا گلدهی بیشترین تعداد آلل مثبت را دارا بودند. در شرایط بدون تنش کم‌ترین تعداد آلل مثبت در ارتباط با تعداد پنجه بارور، تعداد پنجه کل، وزن کل ساقه و تعداد خوشه‌چه اولیه دیده شد. کم‌ترین تعداد آلل مثبت در شرایط تنش خشکی در ارتباط با تعداد دانه پوک، وزن دانه پوک، تعداد خوشه‌چه اولیه، تعداد پنجه کل، تعداد پنجه بارور، عرض برگ پرچم، مساحت برگ پرچم و طول خوشه اصلی مشاهده گردید. وجود مکان‌های ژنی مشترک برای برخی صفات در این تحقیق احتمالاً به دلیل پیوستگی یا پلی‌تروپی مکان‌های کروموزومی است که همبستگی مثبت بین صفات مورفولوژیکی شاهدهی بر این ادعا می‌باشد. بیشترین ضریب تبیین در شرایط بدون تنش (۰/۸۸) مربوط به ارتفاع کل بوته توسط مکان‌های ریزماهواره‌ای RM11943-4، RM20A-1 و RM28099-1 توجیه گردید. کم‌ترین ضریب تبیین در این شرایط مربوط به تعداد پنجه بارور بود. در شرایط تنش خشکی بیشترین ضریب تبیین (۰/۷۶۴) در ارتباط با وزن خوشه اصلی

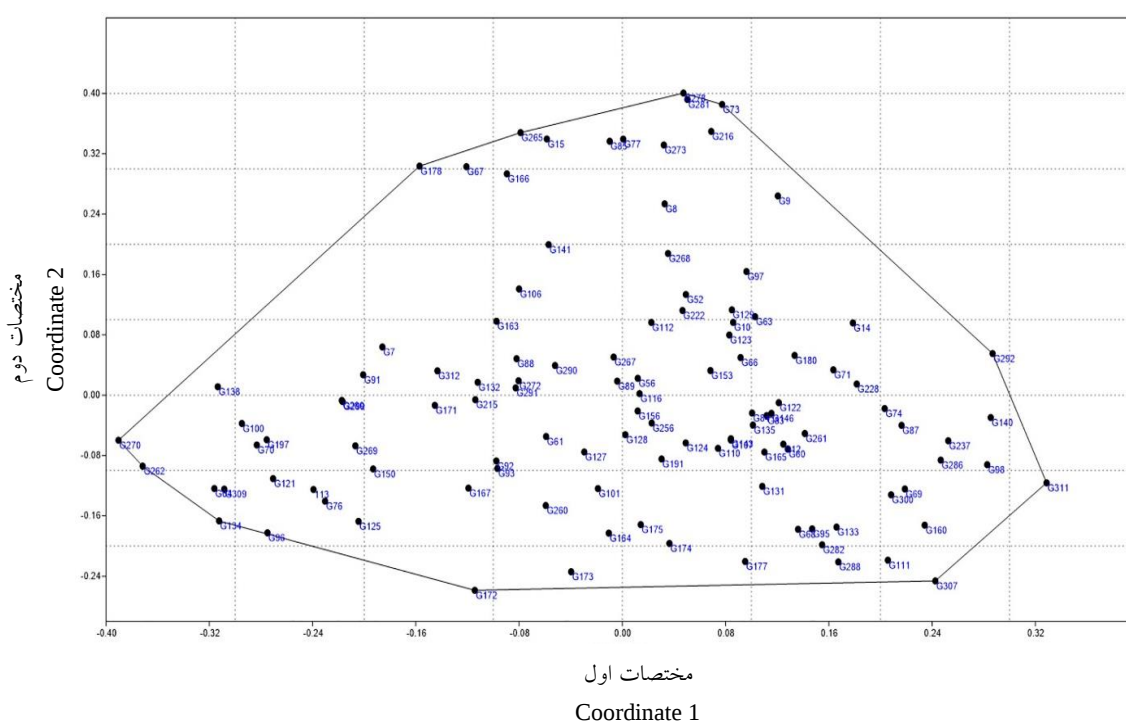
توسط نشانگرهای RM28166-3، RM315-3، RM256-1، RM431-4 و RM28166-2 تبیین شد. کم‌ترین ضریب تبیین در ارتباط با وزن دانه پوک مشاهده شد (جدول ۶ و ۷). در این تحقیق ارتباط بالایی برای نشانگرهای RM11943-4، RM20A-1 و RM28099-1 در شرایط بدون تنش با صفت ارتفاع گیاه و مکان‌های ژنی RM28166-3، RM315-3، RM256-1، RM431-4 و RM28166-2 با وزن خوشه اصلی دیده شد. با توجه به اینکه هردوی این صفات از عوامل مؤثر در عملکرد برنج به‌خصوص در شرایط تنش خشکی می‌باشند، ادامه بررسی‌های مولکولی مثل پوشش در نواحی مجاور این مکان‌ها و بررسی مجدد این مکان‌ها در ژنوتیپ‌های دیگر می‌تواند در شناسایی مکان‌های کنترل‌کننده این صفات در ژنوتیپ‌های برنج مؤثر باشد.

تجزیه خوشه‌ای: گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها با استفاده از نرم‌افزار Power marker بر اساس داده‌های مولکولی با روش UPGMA و معیار ضریب کوفنینگ (۰/۹۲) انجام شد. ژنوتیپ‌ها در ۷ گروه قرار گرفتند (شکل ۲). در یک بررسی با استفاده از ۱۴ نشانگر SSR، ۳۸ ژنوتیپ برنج در ۳ گروه قرار گرفتند (Gharekhani et al., 2016). گروهی از محققین ۲۲ ژنوتیپ برنج را به کمک ۲۱ نشانگر SSR در ۳ گروه مجزا طبقه‌بندی نمودند (Honarvar et al., 2016). نتایج تجزیه خوشه‌ای نشان داد ژنوتیپ‌هایی که در یک گروه قرار دارند با وجود تفاوت‌های ظاهری

شرایط بدون تنش مربوط به ارتفاع کل بوته توسط مکان‌های ریزماهواره‌ای RM11943-4، RM20A-1، RM28099-1، RM85-3، RM72-3 و RM149-1 تبیین گردید. در شرایط تنش خشکی بیشترین تغییرات در ارتباط با وزن خوشه اصلی توسط نشانگرهای RM28166-3، RM315-3، RM256-1، RM431-4 و RM28166-2 تبیین شد. تجزیه خوشه‌ای بر اساس داده‌های مولکولی ژنوتیپ‌ها را به ۷ گروه تقسیم نمود. این نتایج گویای آن است که با توجه به توزیع مناسب DNA تکثیر شده توسط نشانگرهای مورد بررسی، از نشانگرهایی که قدرت تفکیک و پیوستگی بالایی با صفات مهم زراعی مثل ارتفاع و وزن خوشه اصلی دارند و در صورتی که در آزمایش‌های بعدی به تأیید برسند، می‌توان در برنامه‌های به‌نژادی مرتبط با تنش خشکی استفاده نمود.

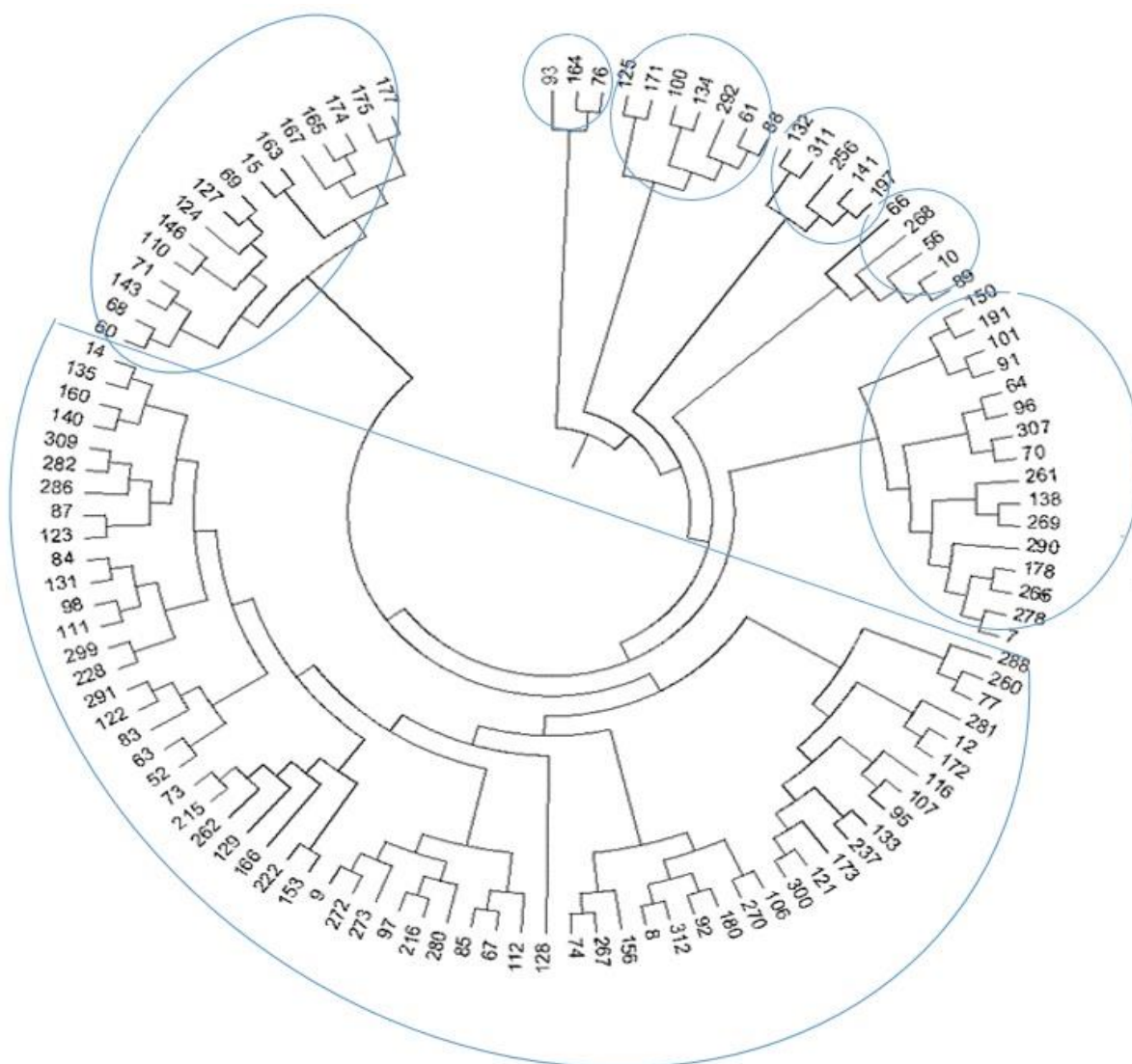
توالی‌های تکراری مشابه در ساختمان ژنوم خود دارند. چون نشانگرهای مورد استفاده جزء نشانگرهای تصادفی می‌باشند، بنابراین قرارگیری ژنوتیپ‌های متفاوت در کنار هم شاید به علت تکثیر مناطق غیررمز کننده توسط نشانگرهای مورد استفاده و تأثیر عوامل محیطی در بروز صفات ریختی ژنوتیپ‌های مورد بررسی در این مطالعه باشد (Masoudi *et al.*, 2017; Roldan-Ruiz *et al.*, 2001).

به طور کلی در این تحقیق دیده شد که کم‌ترین تعداد آل مربوط به نشانگر RM28199 و RM212 و بیشترین آن مربوط به نشانگر RM72 بود. بیشترین میزان اطلاعات چندشکلی مربوط به نشانگرهای RM85 و RM20A و کم‌ترین آن مربوط به نشانگر RM28099 بود و از نظر تنوع ژنی، دو نشانگر RM28099 و RM85 به ترتیب کم‌ترین و بیشترین مقدار را داشتند. بیشترین تغییرات در



شکل ۱- پلات دوبعدی کلاسترها به کمک نشانگرهای ریزماهواره

Figure 1. Two-dimensional plot of clusters by using microsatellite markers



شکل ۲- تجزیه خوشه‌ای ژنوتیپ‌های برنج مورد بررسی بر طبق داده‌های مولکولی به کمک نشانگرهای ریزماهواره

Figure 2. Cluster analysis of rice genotypes based on molecular data using microsatellite markers

جدول ۶- نتایج تجزیه ارتباط با استفاده از رگرسیون گام به گام برای داده‌های مولکولی و صفات مورفولوژیک در شرایط غرقاب در ژنوتیپ‌های برنج

Table 6. Results of association analysis using stepwise regression for molecular data and morphological traits in flood conditions in rice genotypes

ضریب تبیین R ²	نشانه‌های حاوی اطلاعات Markers containing information	Trait	صفت
0.879	RM11943-4** RM20A-1** RM28099-1*	Plant High	ارتفاع گیاه
0.1473	RM28166-1**	Fertilized Tiller	تعداد پنجه بارور
0.242	RM28166-1**	Total Tiller	تعداد پنجه کل
0.383	RM256-1** RM11943-4**	Flag Leaf Length	طول برگ پرچم
0.739	RM20A-3** RM20A-1** RM8085-3** RM28166-1** RM341-2** RM72-6*	Flag Leaf Width	عرض برگ پرچم
0.444	RM431-1** RM28199-1**	Flag Leaf area	مساحت برگ پرچم
0.565	RM11943-4** RM28048-3** RM518-2** RM28199-1*	Panicle Excitation	طول خروج از غلاف
0.640	RM28048-2** RM431-2** RM20A-1** RM12023-1** RM228-3**	Shoot Diameter	قطر ساقه
0.591	RM85-5** RM341-4** RM11943-4**	Panicle Length	طول خوشه اصلی
0.595	RM28166-3** RM256-2**	Main Panicle Weight	وزن خوشه اصلی
0.67	RM11943-4**	Total Shoot Weight	وزن کل ساقه ها
0.567	RM28166-3** RM315-3** RM2121-1*	Filled Grain Number	تعداد دانه پر
0.713	RM72-5** RM8085-1** RM85-1** RM28099-1**	Unfilled Grain Number	تعداد دانه پوک
0.771	RM28166-3** RM315-3* RM256-1** RM3825-4** RM149-4*	Filled Grain Weight	وزن دانه پر
0.693	RM149-3 RM28048-2* RM28099-1** RM3825-2*	Unfilled Grain Weight	وزن دانه پوک
0.293	RM518-2**	Number of Primery Branching	تعداد خوشچه اولیه
0.607	RM315-3** RM341-1** RM228-2**	Number of Secondary Branching	تعداد خوشچه ثانویه
0.430	RM85-4** RM3825-1*	Biomass	بیوماس
0.574	RM85-1** RM315-1*	Day to Flowering	روز تا گلدهی
0.557	RM228-5** RM11943-1*	Harvest Index	شاخص برداشت
0.543	RM256-1** RM20A-3** RM256-2* RM28166-1*	Grain yield	عملکرد
0.487	RM28166-3** RM72-5**	Fertility	باروری

جدول ۷- نتایج تجزیه ارتباط با استفاده از رگرسیون گام‌به‌گام برای داده‌های مولکولی و صفات مورفولوژیک در شرایط تنش خشکی در ژنوتیپ‌های برنج

Table 7. Results of association analysis using stepwise regression for molecular data and morphological traits in drought stress conditions in rice genotypes.

ضریب تبیین R ²	نشانه‌های حاوی اطلاعات Markers containing information	Trait	صفت
0.743	RM11943-4** RM20A-1** RM518-3*	Plant High	ارتفاع گیاه
0.342	RM149-3**	Fertilized Tiller	تعداد پنجه بارور
0.410	RM72-6**	Total Tiller	تعداد پنجه کل
0.565	RM8085-2** RM20A-4**	Flag Leaf Length	طول برگ پرچم
0.307	RM20A-2**	Flag Leaf Width	عرض برگ پرچم
0.227	RM28199-1**	Flag Leaf area	مساحت برگ پرچم
0.631	RM11943-4** RM315-4** RM149-4*	Panicle Excitation	طول خروج از غلاف
0.345	RM11943-1** RM518-1*	Shoot Diameter	قطر ساقه
0.378	RM85-2**	Panicle Length	طول خوشه اصلی
0.647	RM12023-2** RM28166-3** RM256-3* RM341-1*	Total Panicle Weight	وزن کل خوشه ها
0.764	RM28166-3** RM315-3** RM256-1* RM431-4** RM28166-2**	Main Panicle Weight	وزن خوشه اصلی
0.278	RM11943-4** RM3825-1*	Total Shoot Weight	وزن کل ساقه ها
0.565	RM28166-3** RM315-3** RM12023-2*	Filled Grain Number	تعداد دانه پر
0.280	RM431-2*	Unfilled Grain Number	تعداد دانه پوک
0.3654	RM28166-3** RM8085-2* RM431-4* RM256-1*	Filled Grain Weight	وزن دانه پر
0.180	RM149-1**	Unfilled Grain Weight	وزن دانه پوک
0.423	RM3825-3**	Number of Primery Branching	تعداد خوشبچه اولیه
0.414	RM212-2** RM149-1**	Number of Secondary Branching	تعداد خوشبچه ثانویه
0.705	RM85-1** RM256-3** RM3825-3** RM8085-2**	Biomass	بیوماس
0.582	RM85-1** RM28199-1 RM212-2* RM28166-1*	Day to Flowering	روز تا گلدهی
0.672	RM212-2** RM431-4*	Harvest Index	شاخص برداشت
0.727	RM28166-3** RM12023-2** RM228-2* RM228-2*	Grain yield	عملکرد
0.500	RM28166-3** RM431-4**	Fertility	باروری

سپاسگزاری

خشک و نمیه خشک شمال شرق کشور تامین شده است.

بدینوسیله از معاونت علمی و فناوری ریاست جمهوری
تقدیر و تشکر به عمل می‌آید.

بخشی از هزینه‌های اجرای این پژوهش از طرح ملی
تکثیر، توسعه و ترویج ارقام برنج هوازی برای مناطق

References

- Aalami, A. and Karami, K.** (2016). The study of genetic diversity in Iranian rice cultivars using ISSR, IRAP and REMAP markers. *Journal of Crop Breeding*, **20**: 41-51 (In Persian).
- Amini Nasab, R., Ebrahimi M.A., Ebadi, A.A. and Ghodsi, M.** (2012). Study of genetic variation in Iranian rice (*Oryza sativa* L.) varieties by using molecular markers linked with drought resistance genes. *Crop Biotechnology*, **2**: 15-2 (In Persian).
- Amiri, P., Ismaili, A. and Hadian, J.** (2017). Evaluation of Genetic Diversity of Styrian Pumpkin (*Cucurbita pepo* var. styriaca) Populations, Using ISSR Molecular Markers. *Plant Genetic Researches*, **4**: 17-28 (In Persian).
- Anandan, A., Anumalla, M., Pradhan, Sh.K. and Ali, J.** (2016). Population structure, diversity and trait association analysis in rice (*Oryza sativa* L.) germplasm for early seedling vigor (ESV) using trait linked SSR markers. *PLOS ONE*, DOI:10.1371/journal.pone.0152406.
- Awasthi, S. and Lal, J.P.** (2014). Marker assisted selection for the improvement of Sarjoo-52 for drought tolerance by introgression of MQTL1.1 from the source Nagina-22. *Journal of Plant Molecular Breeding*, **2**: 43-55.
- Azizi, H., Aalami, A., Esfahani, M. and Ebadi, A.K.** (2017). Association and structure analysis of some of rice (*Oryza sativa* L.) genetic resources based on microsatellite markers. *Cereal Research*, **7**: 1-16 (In Persian).
- Fazeli, F. and Cheghamirza, K.** (2011). Investigation of genetic diversity in Iranian landrace chickpea bulks using ISSR marker. *Seed and Plant Improvement Journal*, **6**: 97-104 (In Persian).
- Jahani, M., Nematzadeh, G.H. and Mohammadi-Nejad, G.H.** (2016). Genetic diversity analysis in a global panel of rice genotypes by microsatellites. *Journal of Agricultural Biotechnology*, **8**: 20-32 (In Persian).
- Jedari Kouhi, B., Garoosi, G.H. and Hosseini, R.** (2011). Investigation on genetic variation in seedless grapevine cultivars, using RAPD molecular marker. *Cell & Tissue Journal*, **2**: 99-106 (In Persian).
- Haussmann, B.I., Parzies, H.K., Presterl, T., Susic, Z. and Miedaner, T.** (2004). Plant genetic resources in crop improvement. *Plant Genetic Resources*, **2**: 3-21.
- Honarvar, F., Saoburi, H. and Dadras, A.M.** (2016). Study of genetic diversity of rice genotypes by SSR markers and association analysis for related traits to cold tolerance. *Journal of Agricultural Biotechnology*, **8**: 166-173 (In Persian).
- Gharekhani, M., Navabpour, S., Sabouri, H. and Ramezanpour, S.S.** (2016). Study of genetic variation in Iranian rice (*Oryza sativa* L.) using SSR Markers. *Journal of Agricultural Biotechnology*, **8**: 107-115 (In Persian).
- Ghiasy, M., Farahbakhsh, H., Sabouri, H. and Mohamadi Nejad, G.H.** (2013). Evaluation of rice cultivars in drought and normal conditions based on sensitive and tolerance indices. *Electronic Journal of Crop Production*, **6**: 55-75 (In Persian).
- Masoudi, M., Sabouri, H., Taliey, F. and Jafarby, J.A.** (2017). Genetic diversity and association analysis for morphophenologic traits and resistance to Powdery mildew using ISSR, IRAP and iPBS markers. *Crop Biotechnology*, **18**: 41-56 (In Persian).
- Matus, I.A. and Hayes, P.M.** (2002). Genetic diversity in three groups of barley germplasm assessed by simple sequence repeats. *Genome*, **45**: 1095-1106.
- Miah, G., Rafii, M.Y., Ismail M.R., Puteh, A.B., Rahim, H.A., Nurul Islam, Kh. and Abdul Latif, M.** (2013). A review of microsatellite markers and their applications in rice breeding

- programs to improve blast disease resistance. *International Journal of Molecular Sciences*, **14**: 22499-22528.
- Mishra, K.K., Vikram, P., Yadaw, R.B., Swamy, B.M., Dixit, S.H., Cruz, M.T.S., Maturan, P., Marker, S.H. and Kumar, A.** (2013). qDTY12.1: a locus with a consistent effect on grain yield under drought in rice. *BMC Genetics*, **14**: 1-10.
- Mohammadi, S.A. and Prasanna, B.M.** (2003). Analysis of genetic diversity in crop plant- salient statistical tools and consideration. *Crop Science*, **43**: 1235-1248.
- Nikzade Talebi, S., Aalami, A., Esfahani, M. and Ebadi, A.A.** (2016). Evaluation of allic frequency and association analysis of microsatellite markers with some traits related to pre-harvest sprouting in rice (*Oryza sativa* L.) cultivars. *Iranian Journal of Crop Sciences*, **18**: 49-62 (In Persian).
- Park, G.H, Kim, J.H. and Kim, K.M.** (2014). QTL analysis of yield components in rice using acheongcheong/nagdong doubled haploid genetic map. *American Journal of Plant Sciences*, **5**: 1174-1180.
- Raiesi, T. and Sabouri, A.** (2015). Validation and association analysis of microsatellite markers related to drought and salinity tolerance in aerobic and Iranian rice under osmotic stress. *Crop Biotechnology* **10**: 57-72 (In Persian).
- Ranjbar, M., Naghavi, M.R., Zali, A., Aghaei, M.J. and Mardi, M.** (2009). Identification of informative markers of SSR in *Aegilops crassa* accessions of Iran. *Journal of Agriculture*, **11**: 48-57 (In Persian).
- Ribeiro-Carvalho, C., Guedes-Pinto, P., Igrejas, G., Stephenson, P., Schwaraacher, T. and Heslop-Harrison, J.S.** (2004). High levels of genetic diversity throughout the range of the Portuguese wheat landrace 'Barbela. *Annals of Botany*, **94**: 699-705.
- Roldan-Ruiz, F.A., Gilliland, T.J., Dubreuil, P., Dillmann, C. and Lallemand, J.** (2001). A comparative study of molecular and morphological methods of describing relationships between perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) varieties. *Theoretical and Applied Genetics*, **103**: 1138-1150.
- Saghai Mroof, M.A., Biyashev, R.M., Yang, G.P., Zhang, Q. and Allard, R.W.** (1994). Extraordinarily polymorphic DNA in barely species diversity, chromosomal location, and population dynamics, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **91**: 5466-5570.
- Salehi Lisar, S.Y. and Bakhshayeshan Agdam, H.** (2016). *Drought Stress in Plants: Causes, Consequences, and Tolerance*. Springer, Cham, CH.
- Shayan, S., Moghaddam Vahed, M., Norouzi, M., Mohammadi, S.A., Toorchi, M. and Molaei, B.** (2017). Inheritance of Agronomical and Physiological Traits in the Progeny of Moghan3 and Arg Bread Wheat Varieties Cross. *Plant Genetic Researches*, **4**: 43-60 (In Persian).
- Switzer, R.C., Merril, C.R. and Shifrin, S.** (1979). A highly sensitive silver stain for detecting proteins and peptides in polyacrylamide gel. *Analytical Biochemistry*, **98**: 231-237.
- Tavala, R., Aalami, A., Sabouri, H. and Sabouri, A.** (2015). Evaluation of haplotype and allelic diversity of SSR markers linked to major effect QTL on chromosome 9 controlling drought tolerance in rice. *Cereal Research*, **5**: 107-119 (In Persian).
- Valizadeh Soumeh, Z., Samizadeh Lahiji, H. and Rabiei, B.** (2014). Assessment of morphologic and genetic diversity of rice varieties using SSR markers associated with drought tolerance characteristics. *Cereal Research*, **4**: 89-101 (In Persian).
- Vikram, P., Swamy, B.P.M., Dixit, S.H., Trinidad, J., Cruz, M.T.S., Maturan, P.C., Amante, M. and Kumar, A.** (2016). Linkages and Interactions Analysis of Major Effect Drought Grain Yield QTLs in Rice. *PLOS ONE*, DOI:10.1371/journal.pone.0151532.
- Vikram, P., Swamy, B.M., Dixit, S.H., Ahmed, H.U., Cruz, M.T.S., Singh, A.K. and Kumar, A.** (2011). qDTY1.1, a major QTL for rice grain yield under reproductive-stage drought stress with a consistent effect in multiple elite genetic backgrounds. *BMC Genetics*, **12**: 1-15.

- Yashitol, T.M., Sandarm, R., biradar, S. and Thirumuragau, K.** (2004). Sequence specific PCR marker for disting uishing rmice line at the basis of wild abortive cytoplasm for their congate maintir lin. *Crop Science*, **44**: 920-924.
- Zali, H., Hasanloo, T., Sofalian, O., Asghari, A. and Zeinalabedini, M.** (2016). Drought stress effect on physiological parameter and amino acids accumulations in canola. *Journal of Crop Breeding*, **8**: 191-203 (In Persian).

Identification of Informative Alleles Controlling Rice Traits under Flooding and Drought Stress Conditions

Halbibi Badirdast¹, Seyed Yahya Salehi-Lisar², Hossain Sabouri^{3,*}, Ali Movafeghi⁴ and Ebrahim Gholamalalipour Alamdari⁵

- 1- Ph.D. Student, Department of Plant Sciences, Faculty of Natural Sciences, University of Tabriz, Tabriz, Iran
- 2- Associate Professor, Department of Plant Sciences, Faculty of Natural Sciences, University of Tabriz, Tabriz, Iran
- 3- Associate Professor, Department of Plant Production, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Gonbad Kavus, Gonbad Kavus, Iran
- 4- Professor, Department of Plant Sciences, Faculty of Natural Sciences, University of Tabriz, Tabriz, Iran
- 5- Assistant Professor, Department of Plant Production, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Gonbad Kavus, Gonbad Kavus, Iran

(Received: November 1, 2017 – Accepted: April 10, 2018)

Abstract

One of the main objectives of plant breeding is defining the relationship between genotype and phenotype. Nowadays, molecular markers provide powerful tools to evaluate this relationship for plant breeders. In this study, genetic diversity of 112 rice lines was evaluated by 20 pairs of SSR markers which linked to drought tolerant alleles. Totally, 77 polymorphic alleles with mean of 3.85 alleles per primer pairs were amplified. The minimum number of alleles was belonged to RM28199 and RM212 markers with 2 alleles, and the maximum number of alleles was belonged to RM72 marker with 6 alleles. The range of PIC for the examined markers was 0.30 to 0.72 and the mean of PIC was 0.58. The maximum amount of PIC was belonged to RM85 and RM20A markers and the minimum of PIC was belonged to RM28099 marker. Considering the gene diversity coefficient, RM28099 and RM 85 markers had minimum (0.33) and maximum (0.76) diversity, respectively. The stepwise regression analysis of the microsatellite data and morphologic traits identified 62 and 54 informative alleles for the evaluated traits in flooding and drought conditions, respectively. Cluster analysis based on molecular data divided the genotypes into 7 groups. Considering the appropriate distribution of amplified DNA by the studied markers in this study, markers that have high separation power and high association with important agronomic traits in drought stress condition (if further experiments confirmed them), could be employed in plant breeding programs of drought stress.

Keywords: Rice, Cluster analysis, Drought stress, Genetic variety, SSR marker

* Corresponding Author, E-mail: hossein.sabouri@gonbad.ac.ir