



بررسی تنوع آلی برای نشانگرهای مرتبط با کیفیت فیزیکی و شیمیایی برنج در شرایط غرقاب و تنش خشکی

سمیه میری^۱، حسین صبوری^{۲*}، علی اکبر عبادی^۳، سید جواد سجادی^۴

۱. کارشناس ارشد بیوتکنولوژی در کشاورزی، گروه تولیدات گیاهی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه گنبدکاووس

۲. دانشیار گروه تولیدات گیاهی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه گنبدکاووس

۳. استادیار پژوهش، موسسه تحقیقات برنج کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، رشت، ایران

۴. استادیار گروه تولیدات گیاهی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه گنبدکاووس

تاریخ دریافت: ۹۷/۰۹/۲۳؛ تاریخ پذیرش: ۹۸/۰۱/۲۱

چکیده

برنج منبع غذایی اصلی بیش از نیمی از جمعیت جهان بوده و نقش مهمی در تغذیه این جمعیت دارد. از آنجایی که برنج به صورت دانه کامل مصرف می‌شود کیفیت آن اهمیت ویژه‌ای دارد. در راستای بررسی کیفیت فیزیکی و شیمیایی دانه برنج، در سال زراعی ۹۵-۱۳۹۴، ۹۰ ژنوتیپ برنج در قالب طرح لاتیس در شرایط نرمال و تنش خشکی در مزرعه تحقیقاتی دانشگاه گنبدکاووس کاشته شدند. در این تحقیق صفات طول دانه، عرض دانه، محیط دانه، مساحت دانه، قطر معادل، خروج از مرکز، میزان آمیلوز، درصد پروتئین و درجه حرارت ژلاتینه شدن اندازه‌گیری شدند. نتایج سودمندی نشانگرهای ریز ماهواره بیانگر وجود ۵۴ آلل چند شکل و همچنین به‌طور میانگین ۴/۹ آلل برای هر نشانگر بود که بیشترین تعداد آن‌ها مربوط به نشانگرهای RM333 و RM589 با ۷ آلل بود. تجزیه به مختصات اصلی نشانگرهای SSR نشان داد که ۱۰ مؤلفه اول توانستند ۵۵/۵۸ درصد از تغییرات را توجیه نمایند. تعیین الگوی بانندی ژنوتیپ‌های مورد مطالعه نشان داد که در شرایط نرمال برای صفات کیفی، ژنوتیپ‌های 216L، 2-3-93-IR59673 و AZUCENA.BALA.225 دارای بیشترین میزان آمیلوز (به ترتیب با ۲۵/۸، ۲۵/۲ و ۲۴/۵) درصد بودند. نتایج حاصل از بررسی تجزیه ارتباط بین صفات اندازه‌گیری شده با نشانگرهای به‌کاررفته در این آزمایش نشان داد از میان ۱۰۴ آلل مؤثر بر صفات مورد ارزیابی، درجه حرارت ژلاتینه شدن در شرایط نرمال تحت تأثیر سه آلل است و صفات مقدار آمیلوز و میزان پروتئین هر دو تحت تأثیر دو آلل است. آلل RM587-B کنترل‌کننده دو صفت درجه حرارت ژلاتینه شدن و میزان پروتئین در شرایط نرمال است و در سطح یک درصد معنی‌دار می‌باشد. در میان صفات مرتبط با کیفیت دانه برنج در شرایط نرمال آلل RM587-B در کنترل صفات درجه حرارت ژلاتینه شدن و میزان پروتئین مؤثر بود. با توجه به نتایج به‌دست آمده از این ارزیابی می‌توان از این صفات در برنامه‌های به‌نژادی استفاده کرد.

واژه‌های کلیدی: برنج، تجزیه ارتباطی، تنوع آلی، کیفیت، نشانگرهای SSR.

مقدمه

گونه‌های مهم زراعی مورد استفاده قرار گیرد (Dash et al, 1996). دلایل دیگری نیز وجود دارد تا برنج ماده آزمایشی خوبی برای تحقیقات ژنتیکی و مولکولی باشد. به علت قابلیت رشد در شرایط محیطی مختلف، تنوع واریته‌های زراعی برنج

برنج منبع غذایی اصلی برای بیش از نیمی از جمعیت جهان بوده و نقش مهمی در تغذیه آن‌ها دارد. برنج در بین غلات دارای کوچک‌ترین ژنوم از نظر اندازه است و این امر سبب شده تا به‌عنوان گیاه زراعی ایده‌آل در تحقیقات تکاملی غلات و

برنج شامل ۱۰ ژنوتیپ بومی و اصلاح‌شده و ۱۲ ژنوتیپ خارجی و ۲۱ نشانگر SSR استفاده کردند. در مجموع ۸۹ آلل در جمعیت مشاهده شد. بیشترین مقدار اطلاعات چندشکلی (۲۷۷۷/۰) مربوط به آغازگر RM8231 و کمترین مقدار (۲۵۷۳/۰) مربوط به آغازگر RM7424 بود. میزان تنوع ژنی، از کمترین مقدار (۲۷۷۷/۰) مربوط به آغازگر RM7424 تا بیشترین مقدار (۷۸/۰) مربوط به آغازگر RM8231 متغیر بود. جایگاه‌های ریز ماهواره مورد استفاده چندشکلی نسبتاً بالایی را نشان دادند و این مطلب بیان‌کننده آن است که این جایگاه‌ها قدرت بالایی را در تمایز ژنوتیپ‌ها دارند.

صبوری و همکاران (Sabouri et al., 2015)، جهت بررسی ساختار ژنتیکی و مکان‌یابی ژن‌های کنترل‌کننده خصوصیات ظاهری دانه برنج، از ۹۶ لاین اینبرد نو ترکیب (نسل هشتم) حاصل از تلاقی ارقام عنبربو × سپیدرود استفاده نمودند. برای تشکیل نقشه پیوستگی ابتدا تعداد ۳۶۵ نشانگر ریزماهواره و ۳۵ ترکیب آغازگری AFLP در والدین مورد ارزیابی قرار گرفتند. مکان‌یابی فاصله‌ای مرکب بر روی صفات کیفی ظاهری برنج، تعداد ۱۳ QTL برای هشت صفت شناسایی نمود. از این تعداد هشت QTL، بیش از ۱۵ درصد از تغییرات صفات مورد نظر را توجیه نمودند. برای وزن تک‌دانه پخته‌شده، دو QTL، طول و عرض برنج سفید، به ترتیب سه و یک QTL، شکل دانه خام و پخته‌شده به ترتیب دو و سه QTL و برای طول و عرض برنج پخته‌شده به ترتیب سه و یک QTL شناسایی شد.

سرایلو و همکاران (Sarayloo et al., 2015)، در پژوهشی گیاهچه‌های ۲۲ ژنوتیپ برنج تحت دو شرایط (نرمال و تنش خشکی حاصل از مانیتول) را بررسی کردند. برای بررسی تنوع مولکولی بین ژنوتیپ‌ها، DNA ژنومی نمونه‌ها استخراج و توسط ۲۲ جفت آغازگر ریز ماهواره پیوسته با صفات مقاومت به خشکی تکثیر شد. در مجموع، تعداد ۱۰۶ آلل مشاهده شد که تعداد آلل‌های مشاهده‌شده در هر جایگاه از ۲ تا ۷ آلل متغیر و متوسط آن ۴/۸۲ آلل بود. محتوای اطلاعات چند شکل (PIC) برای نشانگرهای مختلف از ۰/۲۹ تا ۰/۸۲ با میانگین ۰/۶۴ و میزان تنوع ژنی از ۰/۳۵۱ تا ۰/۸۴۰ با میانگین ۰/۶۸۶ بود. فاصله ژنتیکی بین ژنوتیپ‌های مورد مطالعه نیز در محدوده ۰/۲۳ تا ۰/۹۹ محاسبه شد. تجزیه خوشه‌ای بر اساس نشانگرهای ریز ماهواره، ژنوتیپ‌های مورد مطالعه را در دو گروه قرارداد. نتایج تجزیه به مختصات اصلی نشان داد که ده مؤلفه اول در مجموع ۹۸/۵۱ درصد از

بیش از سایر گیاهان زراعی است، برنج گیاهی دیپلوئید است و طول ژنوم آن کوتاه است (Derierwala et al., 2000,) (Zhu et al., 2003) از آنجاکه تنوع، ماده خام اصلاح نباتات است و برنج نیز دارای تنوع وسیع ژنتیکی و دامنه سازگاری بالایی می‌باشد، از این رو اتخاذ روش مناسب در جهت اصلاح و معرفی ارقام باکیفیت بالا نیازمند شناخت صحیح از تنوع و ماهیت آن است (Second, 1991; Zhu, et al., 1998) از آنجایی که برنج به صورت دانه کامل مصرف می‌شود کیفیت دانه آن اهمیت ویژه‌ای دارد. در ایران کیفیت برنج عموماً اهمیت بیشتری نسبت به عملکرد داشته و ذائقه ایرانی برنج-های معطر با طول دانه بلند و عرض دانه کم را ترجیح می‌دهد (Sabouri and Hossaini 2017; Mohammadsalehi, 1998). کیفیت پخت به طور مستقیم به صورت مصرفی و غیرمصرفی تعیین می‌شود. در روش غیرمصرفی، روش‌های پخت، طولیل شدن دانه، جذب آب و افزایش حجم و از دست رفتن مواد جامد مورد بررسی قرار می‌گیرند. در روش مصرفی نیز عطروطعم، کیفیت یا ارزیابی حسی، سختی یا نرمی و چسبندگی مورد ارزیابی قرار می‌گیرند (Sabouri and Hossaini 2017; Mohammadsalehi, 1998).

پیشرفت‌های اخیر در زمینه استفاده از نشانگرهای مولکولی و ابداع و توسعه آن‌ها، به‌نژادگران را به استفاده از این نشانگرها به‌عنوان ابزاری قدرتمند برای گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها و انتخاب والدین متنوع از این گروه‌ها واداشته است. نشانگرهای مولکولی، توالی‌های خاصی از DNA هستند که به راحتی آشکار می‌شوند و توارث آن‌ها به‌سادگی قابل‌رؤیت است. در سال‌های گذشته از نشانگرهای مولکولی DNA برای مطالعات پایه‌ای و کاربردی در انسان، حیوان و گیاه استفاده شده است (Naghavi et al., 2015). یک هاپلوتا پ نشان -دهنده تغییرات در ناحیه‌هایی از ژنوم فرد است که طی سال‌های متممادی ثابت باقی می‌مانند همچنین این نواحی در افراد مختلف متفاوت بوده و با استفاده از تفاوت بین این نواحی در ژنوم افراد می‌توان به بررسی تنوع هاپلوتایی پرداخت (Tavalla, 2013). به نظر می‌رسد تنوع هاپلوتا پ‌ها طی نسل‌های متوالی، در نواحی معینی از ژنوم بدون تغییر باقی می‌ماند و این نواحی، ژنوم را به مجموعه‌ای از بلوک‌های هاپلوتایی تفکیک می‌کنند (Mohammadi-nejad, 2010). هنرور و همکاران (Honarvar et al., 2016) به منظور بررسی تنوع ژنتیکی و تجزیه ارتباطی نشانگرهای SSR و صفات مرتبط با تحمل به سرما در برنج، از ۲۲ ژنوتیپ

دانه‌های هر ژنوتیپ به‌طور جداگانه عکس‌برداری شد سپس عکس‌ها به‌وسیله نرم‌افزار MATLAB آنالیز و صفات موردنظر ثبت گردید. این نرم‌افزار طول و عرض دانه را برحسب سانتی‌متر و سه صفت محیط دانه، مساحت دانه و نسبت طول به عرض را بر اساس دو صفت قبلی محاسبه نمود، صفت قطر معادل دانه یعنی مقدار قطر دانه بر اساس محیط را نیز با استفاده از فرمول (۱) (Lio Zhao et al., 2005) محاسبه شد. برای اندازه‌گیری درجه حرارت ژلاتینه شدن از روش لیتل و همکاران (Little et al., 1958)، میزان آمیلوز از روش جولیانو (Juliano, 1985) و میزان نیتروژن یا پروتئین از روش کج‌لدال استفاده شد.

$$[۱] \quad \text{درصد پروتئین} = \frac{\text{مساحت} \times 4}{\pi} = \text{قطر معادل دانه}$$

اسید مصرفی \times نرمالیت‌اسید (۰/۰۲) \times ۱/۴ \times ۶/۲۵ [۲]

در آزمایش‌های مولکولی استخراج DNA نمونه‌ها طبق روش CTAB انجام گرفت (Saghai-Marooft et al, 1994) و DNA های استخراجی در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. سپس از ۱۱ نشانگر ریز ماهواره مرتبط با تحمل به تنش خشکی (جدول ۲) استفاده شد. واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز در حجم ۱۰ میکرو لیتر (جدول ۳) و به‌وسیله دستگاه ترموسایکلر مدل iCycler BIORAD طبق برنامه بهینه شده (جدول ۴) انجام گرفت. محصول حاصل شده از PCR در ژل اکریل آمید ۶٪ و با دستگاه الکتروفورز عمودی مدل Clevear VS20 با ولتاژ ۱۸۰ ولت جداسازی گردیده و باندهای حاصل از الکتروفورز به‌وسیله نیترات نقره رنگ‌آمیزی شدند. امتیازدهی نوارهای حاصل بر روی ژل به‌صورت صفر و یک انجام شد. سپس برای هر آلل، هر ژنوتیپی که واجد نوار موردنظر بود، امتیاز یک و برای ژنوتیپی که واجد نوار موردنظر نبود امتیاز صفر در نظر گرفته شد. همچنین امتیازدهی بر اساس وزن مولکولی به کمک نشانگر اندازه نیز صورت گرفت تا ماتریس داده‌های ژنوتیپی برای تجزیه در نرم‌افزار (Power Marker) (Liu and Muse, 2005) نیز آماده گردید. از این نرم‌افزار جهت محاسبه شاخص تنوع ژنتیکی مثل فراوانی آلی هر مکان ژنی، میزان هتروزیگوسیتی مشاهده‌شده برای هر مکان ژنی و شاخص PIC (شاخص محتوای اطلاعات چندشکلی) و همچنین توزیع آلل‌های جایگاه‌های ژنی در جمعیت استفاده می‌شود (Tavalla, 2013; Tavalla,)

تنوع کل جمعیت را توجیه می‌کنند. گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها بر اساس دو مؤلفه اول آن‌ها را در چهار گروه قرار داد. نظر به وجود تنش کمبود آب در کشور و اهمیت کیفیت فیزیکی دانه برنج برای مصرف‌کننده‌های داخل کشور، بررسی تنوع فنوتیپی و مولکولی برای صفات مذکور در ژنوتیپ‌های برنج جدید وارداتی و اصلاح‌شده داخلی در شرایط تنش خشکی ضروری است. برای این منظور آزمایشی باهدف شناسایی نشانگرهای آگاهی‌بخش مؤثر بر صفات مرتبط با کیفیت دانه برنج با استفاده از تجزیه ارتباطی انجام شد.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه که در سال زراعی ۹۵-۱۳۹۴ در مزرعه تحقیقاتی دانشگاه گنبدکاووس واقع در شرق استان گلستان در طول جغرافیایی ۵۵ درجه و ۱۱ دقیقه شرقی و عرض جغرافیایی ۳۷ درجه و ۱۵ دقیقه شمالی و با ۴۵ متر ارتفاع از سطح دریای آزاد، در قالب طرح لاتیس در ۳ تکرار اجرا شد. هر رقم در کرتی به مساحت ۶ مترمربع (۳×۲) بافاصله ردیف ۲۵ سانتی‌متر کاشته شد. بدین منظور از ۹۰ ژنوتیپ برنج (در قالب تفاهم‌نامه مشترک بین دانشگاه گنبدکاووس و موسسه تحقیقات بین‌المللی برنج و همچنین در قالب تفاهم‌نامه مشترک بین دانشگاه گنبدکاووس و دانشگاه آبردین اسکاتلند، ارقام بومی ایران و همچنین لاین‌های اصلاح‌شده دانشگاه گنبدکاووس) استفاده شد (جدول ۱). در این پژوهش سعی شده است تنوع خوبی از ارقام و لاین‌ها وجود داشته باشد. مزرعه نرمال از همان ابتدا طبق روال معمول در شرایط غرقاب تا پایان دوره رشد قرار داشت و برای اعمال تنش خشکی نیز بعد از اینکه گیاهان به مرحله حداکثر پنجه‌زنی رسیدند، هر ۱۵ روز یک‌بار آبیاری انجام شد. مطابق نتایج منحنی رطوبتی خاک میزان پتانسیل خاک پس از ۱۵ روز تنش ۱۰ - بار و پس از ۳۰ روز از اعمال تنش ۱۵- بار گزارش شد.

در این آزمایش ۶ صفت فیزیکی دانه (برنج قهوه‌ای و سفید) و ۳ صفت کیفی دانه برنج مورد ارزیابی قرار گرفت که عبارت بودند از: طول دانه، عرض دانه، مساحت دانه، محیط دانه، قطر معادل و خروج از مرکز دانه برنج و میزان درصد پروتئین، درصد آمیلوز و درجه حرارت ژلاتینه شدن. از هر واحد آزمایشی ۵ بوته به‌تصادف با حذف اثر حاشیه انتخاب شد. برای اندازه‌گیری ۶ صفت فیزیکی مرتبط با دانه ابتدا از

Table 1. Rrice studied genotypes

جدول ۱. ژنوتیپ‌های برنج مورد مطالعه

شماره No.	نام یا شجره Name or Pedigree	منشأ Origin	شماره No.	نام یا شجره Name or Pedigree	منشأ Origin
1	SANGJO	Iran	46	HHZ 21-SAL13-Y1-Y1	IRRI
2	Dolar	IRRI	47	HHZ 21-Y4-Y2-Y1	IRRI
3	229L	IRRI	48	IR59673-93-2-3	IRRI
4	USEN	IRRI	49	HHZ 26-SAL12-Y1-Y1	IRRI
5	RestorerN5	IRRI	50	HHZ 3-SAL4-Y1-Y1	IRRI
6	CANTURPANTA	IRRI	51	HHZ 4-DT3-Y1-Y1	IRRI
7	216L	IRRI	52	HHZ 4-DT6-LI2-LI1	IRRI
8	Sang Tarom	Iran	53	HHZ 4-SAL12-LI1-LI1	IRRI
9	Zeriah	Iran	54	HHZ 6-DT1-LI1-LI1	IRRI
10	MOHAMMADI	Iran	55	IR14L110	IRRI
11	AZUCENA.BALA.21	Scotland- Improved line	56	IR14L103	IRRI
12	AZUCENA.BALA.88	Scotland- Improved line	57	IR12L353	IRRI
13	AZUCENA.BALA.111	Scotland- Improved line	58	IR12L356	IRRI
14	AZUCENA.BALA.114	Scotland- Improved line	59	IR747719-145-2-3-3	IRRI
15	AZUCENA.BALA.169	Scotland- Improved line	60	IR13L382	IRRI
16	AZUCENA.BALA.189	Scotland- Improved line	61	IR74721-199-1-3-2	IRRI
17	AZUCENA.BALA.225	Scotland- Improved line	62	IR74481-146-3-2	IRRI
18	AZUCENA.BALA.265	Scotland- Improved line	63	IR 10F221	IRRI
19	AZUCENA.BALA.285	Scotland- Improved line	64	IR 11A410	IRRI
20	AZUCENA.BALA.292	Scotland- Improved line	65	IR 11A534	IRRI
21	HHZ 15-SAL13-Y1	IRRI	66	IR6962B	IRRI
22	HHZ 18-Y3-Y1-Y1	IRRI	67	IR75481-108-3-3	IRRI
23	HHZ 1-DT3-Y1-Y1	IRRI	68	IR75489-75-2-1	IRRI
24	IR71739-24-3-5	IRRI	69	IR 11C123	IRRI
25	HHZ 1-DT7-LI2-LI1	IRRI	70	AHLNAD.2	IRAN- Improved line
26	HHZ 21-SAL13-Y1-Y1	IRRI	71	AHLNAD.8	IRAN- Improved line
27	HHZ 21-Y4-Y2-Y1	IRRI	72	AHLNAD.18	IRAN- Improved line
28	HHZ 22-Y3-DT1-Y1	IRRI	73	AHLNAD.27	IRAN- Improved line
29	HHZ 23-DT16-DT1-DT1	IRRI	74	AHLNAD.34	IRAN- Improved line
30	HHZ 26-SAL12-Y1-Y1	IRRI	75	GHBNAM.2	IRAN- Improved line
31	HHZ 2-SUB2-DT1-DT1	IRRI	76	GHBNAM.140	IRAN- Improved line
32	HHZ 3-SAL13-Y2-DT1	IRRI	77	GHBNAM.22	IRAN- Improved line
33	HHZ 3-SAL6-Y1-Y1	IRRI	78	GHBNAM.105	IRAN- Improved line
34	HHZ 4-DT3-Y1-Y1	IRRI	79	GHBNAM.111	IRAN- Improved line
35	HHZ 4-DT6-LI2-LI1	IRRI	80	AHLSPD.4	IRAN- Improved line
36	HHZ 4-SAL12-LI1-LI1	IRRI	81	AHLSPD.92	IRAN- Improved line
37	HHZ 4-SAL5-LI1-LI1	IRRI	82	AHLSPD.11	IRAN- Improved line
38	HHZ 4-SAL5-Y2-Y1	IRRI	83	AHLSPD.14	IRAN- Improved line
39	HHZ 6-DT1-LI1-LI1	IRRI	84	AHLSPD.16	IRAN- Improved line
40	IRRI 104	IRRI	85	ANBNAD.1	IRAN- Improved line
41	HHZ 10-DT5-LI1-LI1	IRRI	86	ANBNAD.3	IRAN- Improved line
42	HHZ 15-DT7-SAL2	IRRI	87	ANBNAD.7	IRAN- Improved line
43	HHZ 15-SAL13-Y1	IRRI	88	ANBNAD.21	IRAN- Improved line
44	HHZ 15-SAL13-Y3	IRRI	89	ANBNAD.29	IRAN- Improved line
45	HHZ 1-DT13-Y1-Y1	IRRI	90	ANBNAD.22	IRAN- Improved line

جدول ۲. لیست و توالی نشانگرهای پیوسته به QTLهای مرتبط با کیفیت برنج

Table 4. List and sequence of continuous markers to QTL related to rice quality

نشانگر Marker	توالی رفت Forward	توالی برگشت Reverse	منبع References
RM587	ACGCGAACAAATTAACAGCC	CTTTGCTACCAGTAGATCCAGC	Mei et al., 2012
RM3370	GTGCTTAGAGCATATAACG	AAATCTTGAAAAATCTTCT	Cho et al., 2014
RM217	ATCGCAGCAATGCCTCGT	GGGTGTGAACAAAAGACAC	Cho et al., 2014
RM589	ATCATGGTTCGGTGGCTTAAC	CAGGTCCAACCAGACACTG	Cho et al., 2014
RM529	CCCTCCCTTCTGTAAGCTCC	GAAGAACAATGGGGTTCTGG	Sato et al., 2004
RM5642	CCGTTGTATGTAAGTACAG	AGAGAGAGAACTATTCGATG	Cho et al., 2014
RM484	TCTCCCTCCTCACCATTGTC	TGCTGCCCTCTCTCTCTCTC	Cho et al., 2014
RM333	GTACGACTACGAGTGTCAACAA	GTCTTCGCGATCACTCGC	Cho et al., 2014
RM5558	GCTGACTTCACACTGCGATC	GGCCACTTCCAAAACATCAG	MO et al., 2013
RM1161	AAACTGTTTTACCCTGGCC	ATCCCCTTCTGCGGTAAC	Cho et al., 2014
RM3498	GTGAAAGTCGGTGACGATGG	ACTTAGGGGATCAGGGGATG	Cho et al., 2014
RM6349	CGTCCACTCGTGACAATGAC	TGATCTCCTCCTCCTCTCC	Cho et al., 2014

جدول ۳. مواد مورد استفاده در واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز در نشانگر SSR

Table 2. Material used for polymerase chain reaction in SSR marker

اجزای واکنش The components of the reaction	مقدار مواد (میکرو لیتر) Amount of material (µl)	غلظت مواد Concentration of substances
بافر 10X	1	1X
MgCl ₂	0.48	50 mM
dNTP	0.6	10 mM
آنزیم Taq DNA پلی‌مراز	0.12	
آغازگر رفت	0.75 µl	60 ng
آغازگر برگشت	0.75 µl	60 ng
DNA رقیق شده	2.5 µl	0.5-0.75 ng
H ₂ O	3.8 µl	
حجم نهایی	10 µl	

جدول ۴. برنامه حرارتی برای تکثیر جایگاه‌های ریز ماهواره

Table 3. Thermal program for microwave satellite propagation

تعداد چرخه Number of cycles	زمان (دقیقه) و (ثانیه) Time (min) and (second)	دما (°C) Temperature (°C)	مرحله The level
1	5'	95	واسرشته سازی اولیه DNA
	45''	95	واسرشته سازی DNA
10	45''	-	اتصال آغازگرها
	45''	72	سنتز
25	45''	95	واسرشته سازی DNA
	45''	-	اتصال آغازگرها
1	45''	72	سنتز
	5'	72	تکثیر نهایی

از روابط رگرسیون و به کمک نرم‌افزار SPSS مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

آنالیز هاپلوتایپی ژنوتیپ‌ها از طریق بررسی ژل‌ها صورت گرفت. تجزیه خوشه‌ای و رابطه بین هر کدام از صفات ثبت شده با نشانگرهای SSR با استفاده

نتایج و بحث

سودمندی نشانگرهای ریز ماهواره مورد مطالعه

تجزیه اطلاعات به دست آمده از نشانگرها (جدول ۴) بیانگر وجود ۵۴ آلل چند شکل و همچنین به طور میانگین ۴/۹ آلل برای هر نشانگر بود که بیشترین تعداد مربوط به RM333 و RM589 با ۷ آلل بود. بالاترین مقدار محتوی اطلاعات چندشکلی (PIC) را نشانگر RM589 و کمترین مقدار را نشانگر RM217 نشان داد، میانگین محتوی اطلاعات چندشکلی نیز ۰/۶۳ بود. مقدار تنوع ژنی نیز بین ۰/۴۰ الی ۰/۷۸ با میانگین ۰/۶۷ بود؛ که نشانگرهای RM589 و RM6349 دارای بیشترین مقدار و نشانگر RM217 دارای کمترین مقدار در این بخش بود. تعداد آلل مؤثر نیز میانگینی برابر با ۰/۴۱ داشت که بیشترین مقدار مربوط به نشانگر RM3370 بوده و نشانگر RM589 کمترین مقدار را در بین دیگر نشانگرها دارا بود. نشانگر RM3370 (۰/۳۸۳۱) بیشترین مقدار شاخص نی و نشانگر RM589 (۰/۲۵۵۹) کمترین مقدار شاخص نی و همچنین نشانگر RM3370 (۰/۵۶۷۳) بیشترین مقدار شاخص شانون و نشانگر RM333 (۰/۴۰۶۱) کمترین مقدار شاخص شانون را به خود اختصاص دادند. نشانگرهایی که دارای آمارهای تنوع بالاتری هستند از قدرت تفکیک بیشتری برخوردار می‌باشند و احتمالاً بتوان از آن‌ها در غربال ژنوتیپ‌ها بهره بیشتری برد (Tavalla et al., 2015). در بررسی ۴۸ ژنوتیپ برنج بر اساس ۹ نشانگر ریز ماهواره، در مجموع ۳۱ آلل با میانگین ۳/۴۴ آلل در هر مکان ژنی مشاهده شد. نشانگرهای RM22 و RM12093 با دارا بودن بیشترین میزان محتوی اطلاعات چندشکلی و تنوع ژنی و تعداد آلل در این مطالعه به عنوان بهترین نشانگر جهت بررسی تنوع ژنی ژنوم برنج شناسایی شدند (Gholizadeh, 2015; Gholizadeh et al., 2015). رضایی و رضایی و همکاران (2017; Rezaei et al., 2015; Rezaei, 2015) ۹۶ ژنوتیپ جو را با استفاده از هفت نشانگر ریز ماهواره مرتبط با تحمل به تنش اسیدیته خاک مورد تجزیه و تحلیل قرارداد. در مجموع ۲۲ آلل با میانگین ۳/۱۴ آلل در هر مکان ژنی مشاهده شد. نشانگرهای Do و Cit7 با پنج آلل دارای بیشترین تعداد آلل بودند. میانگین محتوی اطلاعات چند شکل (PIC) ۰/۴۱ برآورد شد که نشانگر HvMATE-21indel با ۰/۷۰۵ بیشترین و Cit7 با ۰/۲۶۵ کمترین مقدار PIC را نشان دادند. نشانگر HvMATE-21indel با بیشترین میزان محتوی اطلاعات چندشکلی و تنوع ژنی و

تعداد آلل به عنوان بهترین نشانگر جهت بررسی تنوع ژنی روی کروموزوم ۷ از ژنوم جو شناسایی شد.

تجزیه به مؤلفه‌های اصلی نشانگرهای SSR مرتبط به

تحمل خشکی

در این بررسی ۱۰ مؤلفه توانستند ۵۵/۵۸ درصد از تغییرات را توجیه نمایند. با توجه به (جدول ۶) اولین مؤلفه ۹/۷۳۳۲ درصد از تغییرات را توجیه می‌کند و مؤلفه دوم ۷/۴۶۱۵ درصد از تغییراتی که مؤلفه اول توجیه نمی‌کرد را توجیه نمود. به همین ترتیب روند توجیه تغییرات توسط مؤلفه‌ها ادامه دارد و در نهایت مؤلفه دهم ۳/۴۸۸۵ درصد از تغییراتی که توسط ۹ مؤلفه قبلی توجیه نشده بود را توجیه کرد. رضایی (Rezaei, 2017) پژوهشی که روی گیاه جو داشت، اظهار نمود که ۱۵ مؤلفه توانستند ۸۱/۹۳ درصد از تغییرات را توجیه نمایند. با توجه به نتایج، اولین مؤلفه ۱۰/۵۹ درصد از تغییرات را توجیه می‌کند و مؤلفه دوم ۹/۱۴ درصد از تغییراتی که مؤلفه اول توجیه نمی‌کرد را توجیه نمود. برخلاف صفات فنوتیپی که در بیشترین موارد و مخصوصاً هنگامی که صفت دارای همبستگی بالا باشد، دو مؤلفه اول بیش از ۹۰ درصد تغییرات را توجیه می‌کنند، در داده‌های نشانگرهای مولکولی امکان توجیه مقادیر بیشتر واریانس متغیرهای اولیه توسط چند مولف‌های اصلی وجود ندارند. در بررسی تنوع ژنتیکی با استفاده از داده‌های مولکولی بهترین حالت این است که نشانگرها توزیع یکنواخت و مناسب در ژنوم داشته باشند تا بتوانند کل ژنوم را نمونه برداری کنند. لذا در صورتی که نشانگرها از بخش‌های مختلف ژنوم انتخاب شده باشند همبستگی بین آن‌ها کم خواهد بود و در نتیجه تعداد بیشتری مؤلفه برای توجیه تغییرات کل آن‌ها لازم است.

تعیین ژنوتیپ‌های بحرانی با استفاده از تجزیه به

مختصات اصلی

تجزیه بای پلات با استفاده از نتایج تجزیه به مختصات اصلی بر اساس نشانگرهای ریز ماهواره نشان داد که ژنوتیپ‌های (2)Dolar، (4)USEN، (10)MOHAMMADI، (15)AZUCENA.BALA.169، (3-24)IR71739-24-3، (24)5، (38)HHZ4-SAL5-Y2-Y1، (1-199)IR74721-199-1، (61)3-2، (76)GHBAM.140، (85)ANBNAD.1 و (89)29(89)ANBNAD.29 جزئی از ژنوتیپ‌های بحرانی بوده و ژنوتیپ‌های مذکور با توجه به الگوی بانندی بیشترین تأثیر را

در گروه‌بندی ارقام و لاین‌ها داشتند. ژنوتیپ‌هایی که در رأس چندضلعی حاصل از نمودار مختصات اصلی ظاهر می‌شود (۱). نقش مهم‌تری در گروه‌بندی دارند (Davis, 1986). (شکل

جدول ۵. شاخص‌های تنوع نشانگرهای ریز ماهواره در ژنوتیپ‌های برنج مورد مطالعه

Table 5. The diversity indices of microsatellite markers in studied rice genotypes

نشانگر Marker	کروموزوم Chromosome	تعداد آل Na	تنوع ژنی Gene diversity	فراوانی آل بزرگ Large allele abundance	تعداد آل مؤثر Ne	شاخص نی H	شاخص شانون I	محتوای اطلاعات چندشکلی Pic
RM587	6	4	0.67	0.38	1.540	0.319	0.482	0.60
RM3370	6	3	0.57	0.56	1.657	0.383	0.567	0.51
RM217	6	3	0.40	0.74	1.400	0.274	0.441	0.37
RM589	6	7	0.78	0.31	1.381	0.255	0.407	0.75
RM5642	5	5	0.77	0.29	1.476	0.312	0.487	0.74
RM484	10	4	0.67	0.44	1.567	0.338	0.512	0.62
RM333	10	7	0.66	0.44	1.434	0.259	0.406	0.61
RM5558	5	5	0.71	0.36	1.479	0.289	0.441	0.66
RM1161	6	6	0.75	0.34	1.471	0.293	0.454	0.71
RM3498	6	4	0.70	0.37	1.590	0.363	0.547	0.64
RM3498	3	6	0.78	0.25	1.479	0.310	0.483	0.74
Mean		4.9	0.67	0.41	1.497	0.309	0.475	0.63
Total		54	7.46	4.51				6.95

جدول ۶. مقادیر ویژه، واریانس دو عامل و واریانس تجمعی برای ده مؤلفه اصلی

Table 6. Eigen value, two factors variance and cumulative variance for ten principal components

مؤلفه اصلی Principal component	مقادیر ویژه Eigen value	واریانس هر مؤلفه The variance of each component	واریانس تجمعی Cumulative variance
1	3.11	9.733	9.37
2	2.38	7.461	17.19
3	1.97	6.171	23.36
4	1.90	5.941	29.3
5	1.79	5.603	34.9
6	1.51	4.740	39.64
7	1.42	4.466	44.1
8	1.34	4.206	48.3
9	1.21	3.805	52.1
10	1.11	3.488	55.58

تکراری مشابه هستند اختلاف بین ژنوتیپ‌ها می‌تواند ناشی از پدیده‌های مختلف جهش‌زایی، از جمله کراسینگ اور نابرابر و عدم جفت شدن بوده باشد. قلی‌زاده (Gholizadeh, 2015) در پژوهشی جهت گروه‌بندی ژنوتیپ‌های برنج از تجزیه خوشه‌ای بر اساس روش UPGMA و ضریب تشابه جاکارد استفاده نمود و برش دندروگرام در فاصله ۲۵ واحدی باعث گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها در ۳ گروه گردید که نتایج گروه‌بندی بر اساس تجزیه خوشه‌ای مطابق با فاصله ژنوتیپ‌ها، در ماتریس فاصله ژنتیکی بود. چاکراواری و ناروانتی (Chakravarthi and Naravaneni, 2006) تنوع ژنتیکی در ۱۵ ژنوتیپ با استفاده از ۳۰ نشانگر ریز ماهواره روی کروموزوم شماره ۷ تا ۱۲ را بررسی نمودند. تجزیه خوشه‌ای، ژنوتیپ‌های برنج را به

خوشه‌بندی ژنوتیپ‌ها با استفاده از داده‌های مولکولی

تجزیه خوشه‌ای بر مبنای روش UPGMA و ضریب تشابه جاکارد برای ژنوتیپ‌های مورد مطالعه است. خط برش بر اساس فرمول $\sqrt{\frac{N}{2}}$ که N تعداد ژنوتیپ‌های انتخاب شده است (Johnson and Wichern, 2008). برش دندوگرام موجب گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها در شش گروه در شرایط تنش خشکی گردید. این گروه‌ها به ترتیب دارای ۱۶، ۳۳، ۱۰، ۸، ۹، ۱۴ ژنوتیپ در زیرمجموعه خود دارند. در بین این گروه‌ها گروه شش بیشترین میانگین را از نظر روز تا گلدهی، ارتفاع بوته و عملکرد در هکتار را هم در شرایط غرقاب و هم در شرایط تنش خشکی نشان داد. ژنوتیپ‌هایی که در یک گروه قرار گرفتند، با وجود تفاوت‌های ظاهری دارای تعداد توالی‌های

ژنوتیپ IR14L110 با ۱۱/۵۱ بیشترین مقدار را دارا است که در فرایند معرفی ارقام الگوی باندی مذکور مدنظر قرار گیرد تا ارقام جدید از نظر طول دانه بلندتر باشند.

برای صفت عرض دانه برنج قهوه‌ای الگوی باندی ژنوتیپ HHZNAM.105 با ۴/۳۶ بیشترین و ژنوتیپ HHZ26-SAL12-Y1-Y1 با ۳/۱۳ کمترین مقدار است که از نظر بازارپسندی ارقام با عرض دانه کمتر بیشتر موردپسند قرار می‌گیرند. صفت طول دانه سفید الگوی باندی ژنوتیپ IR59673-93-2-3 با ۹/۹۸ درصد بیشترین و ژنوتیپ AZUCENA.BALA.265 با ۷/۲۵ درصد کمترین مقدار می‌باشد و برای صفت عرض دانه سفید الگوی باندی ژنوتیپ AHLNAD.8 با ۳/۹۹ درصد بیشترین و ژنوتیپ HHZ4-SAL5-L11-L11 با ۲/۹۷ درصد کمترین مقدار را دارا است. در شرایط تنش خشکی برای صفات کیفی، برای صفت مقدار آمیلوز الگوی باندی ژنوتیپ HHZ2-SUB2-DT1-DT1 با ۲۵/۱ درصد بیشترین و ژنوتیپ HHZ4-SAL5-L11-L11 و IR14L103 با ۲۰/۵ کمترین مقدار را در اختیار دارند. الگوی باندی ژنوتیپ AZUCENA.BALA.111 با ۲۱/۳۶۲ درصد برای صفت پروتئین بیشترین مقدار و ژنوتیپ HHZ3-SAL6-Y1-Y1 و HHZ26-SAL12-Y1-Y1 با ۱۰/۲۳۶ درصد کمترین مقدار را دارا است.

برای صفت درجه حرارت ژلاتینه شدن الگوی باندی ژنوتیپ HHZ4-SAL12-L11-L11 با ۶/۸ درصد بیشترین مقدار و ژنوتیپ IR15L110 و IR12L353 با ۳ درصد کمترین مقدار را دارا می‌باشد که از بین این الگوی باندی بهتر است ارقامی که دارای درجه حرارت ژلاتینه شدن حد واسط هستند انتخاب شوند. برای صفات کمی در شرایط تنش خشکی، صفت طول دانه برنج قهوه‌ای ژنوتیپ SANGJO با ۱۱/۵۷ درصد بیشترین میزان و ژنوتیپ AZUCENA.BALA.265 با ۸/۲۹ درصد کمترین مقدار را دارا است. برای صفت عرض دانه برنج قهوه‌ای، ژنوتیپ AZUCENA.BALA.265 با ۴/۰۹ بیشترین عرض دانه و ژنوتیپ HHZ4-SAL12-L11-L11 با ۳/۰۵ کمترین مقدار عرض دانه را دارا است. برای صفت طول دانه سفید، الگوی باندی ژنوتیپ AHLNAD.8 با ۸/۹۳ بیشترین و ژنوتیپ AZUCENA.BALA.265 با ۶/۶۶ کمترین مقدار را نشان دادند. برای صفت عرض دانه سفید الگوی باندی ژنوتیپ AZUCENA.BALA.285 با ۳/۶۳ درصد بیشترین میزان و ژنوتیپ HHZ2-SUB2-DT1-DT1 با ۲/۸۷ کمترین

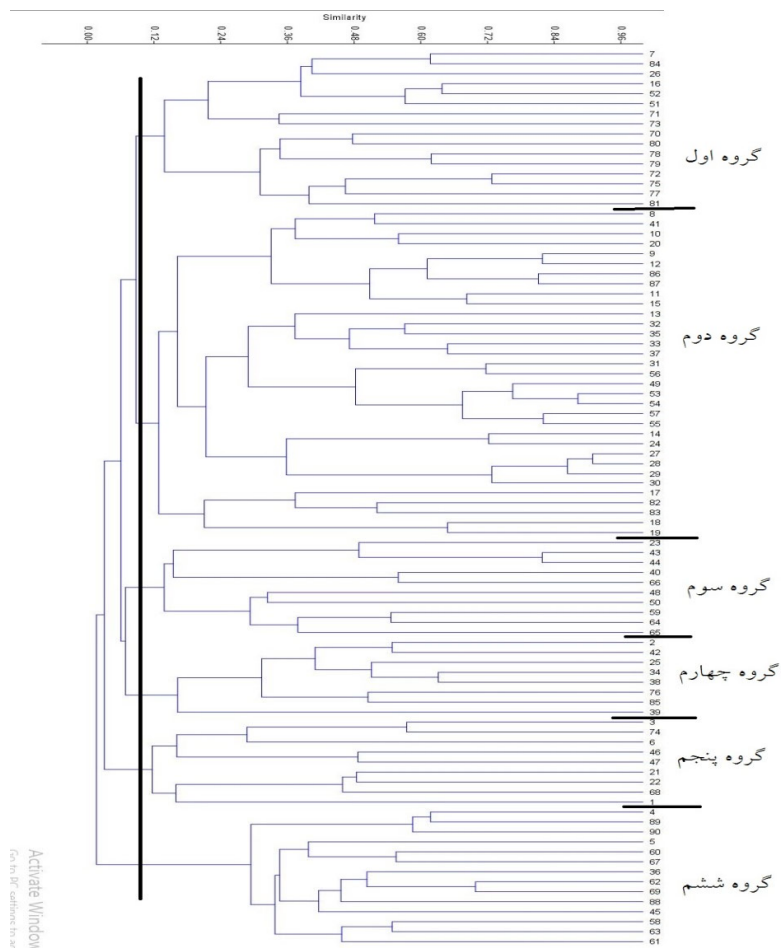
۱۰ گروه که در آن‌ها انواع ژاپونیکا به‌طور جداگانه از ایندیکا قرارگرفته بودند تقسیم کرد. ربانی و همکاران (Rabani et al., 2010) نیز به بررسی ۴۱ رقم برنج توسط ۳۰ نشانگر SSR انتخاب‌شده از کل ژنوم برنج پرداختند. دندروگرام بر اساس تجزیه خوشه‌ای ۴۱ رقم برنج را به دو گروه تقسیم کرد. این نتایج نشان داد که نشانگر ریز ماهواره ابزاری کارآمد برای نمایش تنوع ژنتیکی بین ژنوتیپ‌های برنج بود (شکل ۲).

تعیین الگوی باندی ژنوتیپ‌ها

پس از بررسی الگوهای باندی تشکیل‌شده بر روی ژل پلی اکریل آمید، به‌منظور ارزیابی نشانگرهای ریز ماهواره مرتبط با خشکی در برنج، از ۱۱ نشانگر متعلق به این ناحیه که در نزدیک‌ترین مکان نسبت به آن قرارگرفته‌اند، روی ۹۰ ژنوتیپ مورد مطالعه استفاده شد (جدول ۵). ژنوتیپ‌های مورداستفاده از لحاظ مطابقت الگوی آلی با یکدیگر گروه‌بندی شده و میزان آمیلوز، درجه حرارت ژلاتینه شدن و درصد پروتئین صفات کیفی و صفات کمی طول و عرض دانه برنج قهوه‌ای و سفید شده هر گروه به‌عنوان معیار سنجش گروه‌ها و مقایسه برای میزان تحمل به خشکی قرار گرفت. پس‌ازاینکه پرایمرهای مورداستفاده در ژنوتیپ‌های مورد مطالعه تکثیر شدند با بررسی ژل‌ها ژنوتیپ‌هایی که دارای یک الگوی باندی مشابه بودند به‌عنوان یک گروه هاپلو تایی انتخاب شدند؛ که طی این بررسی ۲۰ گروه تشکیل شد. در شرایط نرمال برای صفات کیفی، صفت آمیلوز ژنوتیپ‌های IR59673-93-2-3، L216، IR59673-93-2-3، L216 و AZUCENA.BALA.225 هرکدام به ترتیب با ۲۵/۸، ۲۵/۲ و ۲۴/۵ درصد بیشترین مقدار آمیلوز و ژنوتیپ‌های HHZNAM.22 و IR14L110، HHZ6-DT1-L11-L11 هرکدام به ترتیب با ۲۰/۱۹، ۵/۸ و ۲۰/۶۰ درصد کمترین درصد آمیلوز را دارا می‌باشند. برای صفت پروتئین الگوی باندی ژنوتیپ HHZ6-DT1-L11-L11 با ۳۲/۲۲ درصد بیشترین مقدار و بعداز آن ژنوتیپ‌های IR14L103 و AZUCENA.BALA.285 هرکدام به ترتیب با ۳۱/۲۶ و ۲۸/۰۱ درصد و ژنوتیپ HHZ26-SAL12-Y1-Y1 با ۱۵/۹۳ درصد کمترین مقدار را دارا است. برای صفت درجه حرارت ژلاتینه شدن الگوی باندی ژنوتیپ SANGJO با ۶/۸ درصد بیشترین و ژنوتیپ AZUCENA.BALA.111، ZUCENA.BALA.111 و IR11A534، IR14L110، IR59673-93-2-3 و GHBNAM.105 با ۳ درصد کمترین مقدار را دارا است. برای صفات کمی، صفت طول دانه برنج قهوه‌ای الگوی باندی

الگوی باندی که به دست آمده است استفاده گردد. در پژوهشی به منظور ارزیابی هاپلوتایپی نشانگرهای ریز ماهواره QTL های بزرگ اثر مرتبط با خشکی در برنج از ۹ نشانگر روی ۴۸ ژنوتیپ مورد مطالعه استفاده شد. ژنوتیپ های مورد بررسی از لحاظ مطابقت آلی با یکدیگر گروه بندی شدند و میزان عملکرد، ارتفاع بوته، تعداد دانه پر و روز تا رسیدگی هر گروه هاپلوتایپ به عنوان معیار برای سنجش گروه ها و مقایسه برای بررسی میزان مقاومت به خشکی در نظر گرفته شد. در این بررسی ۲۵ گروه هاپلوتایپ تشکیل شد (Gholizadeh, et al., 2015). در تحقیقی دیگر تولی و همکاران (Tavalla et al., 2015) از تجزیه ۲۲ ژنوتیپ برنج به ۱۶ هاپلوتایپ مختلف دست یافتند که هاپلوتایپ شماره ۸ شامل ژنوتیپ های دیلمانی و IR25571، بیشترین شباهت به ژنوتیپ Bala داشتند.

میزان را نشان داد. برای صفت طول دانه برنج قهوه ای، الگوی باندی ژنوتیپ SANGJO با بیشترین مقدار و ژنوتیپ AZUCENA.BALA.265 با کمترین مقدار، برای صفت عرض دانه برنج قهوه ای الگوی باندی ژنوتیپ HHZ26- SAL12-Y1-Y1 دارای مقدار کم، برای صفت طول دانه سفید الگوی باندی ژنوتیپ SANGJO با مقدار زیاد و ژنوتیپ AZUCENA.BALA.265 با میزان کم و برای صفت عرض دانه سفید الگوی باندی ژنوتیپ AZUCENA.BALA.265 جزو بالاترین مقدار و ژنوتیپ IR59673-93-2-3 جزو کمترین مقدار می باشند که در هر دو محیط نرمال و تنش مشترک هستند. نتیجه به دست آمده از این گروه بندی هاپلوتایپی نشان می دهد که برای هر کدام از صفات طول و عرض دانه برنج قهوه ای و سفید شده و همچنین مقدار آمیلوز و درصد پروتئین و درجه حرارت ژلاتینه شدن بهتر است از



شکل ۲. گروه بندی ژنوتیپ های مورد مطالعه با استفاده از نشانگرهای ریز ماهواره متصل به QTL های کنترل کننده تحمل به خشکی بر

اساس ضریب جاکارد و روش گروه بندی UPGMA

Fig. 2. Clustering of the studied genotypes using microsatellite markers linked to the QTL controlling drought tolerance on Jaccard's coefficient and UPGMA method.

جدول ۵. الگوی باندی برای نشانگرهای ریز ماهواره مورد مطالعه

Table 5. Banding pattern for studied microsatellite markers																				
RM587	A	A	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	C	C	C	C
RM3370	B	C	A	A	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	C	C	B	B	B	C
RM217	B	B	A	C	A	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B
RM589	C	E	C	A	A	D	D	D	E	E	E	F	F	C	E	E	A	D	E	C
RM5642	B	B	C	C	C	B	B	B	E	E	E	D	E	C	B	E	D	B	E	C
RM484	A	C	A	C	A	B	B	C	A	B	B	B	B	B	B	B	C	B	C	D
RM333	A	B	C	A	C	B	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	D	C	B	A
RM5558	D	B	D	B	D	E	D	A	B	B	B	B	C	D	D	C	D	B	B	B
RM1161	C	D	C	A	D	C	B	C	C	B	D	C	C	D	C	C	C	D	B	C
RM3498	C	A	B	A	B	C	C	C	A	B	B	A	B	B	C	A	D	B	B	D
RM6349	A	B	B	C	B	B	D	D	D	C	D	D	D	C	D	D	C	B	C	C
Haplotype	1	13	17	18	19	31	32	33	37	39	48	49	53	54	55	56	57	65	71	78
	Normal										نرمال									
طول دانه برنج قهوه‌ای	Grain length of brown rice																			
عرض دانه برنج قهوه‌ای	Grain width of brown rice																			
طول دانه سفید	Grain length of White rice																			
عرض دانه سفید	Grain width of whiterice																			
آمیلاز	Amylose																			
ژلاتینه شدن	Gelatinization																			
پروتئین	Protine																			
	Drought										خشکی									
طول دانه برنج قهوه‌ای	Grain length of brown rice																			
عرض دانه برنج قهوه‌ای	Grain width of brown rice																			
طول دانه سفید	Grain length of White rice																			
عرض دانه سفید	Grain width of whiterice																			
آمیلاز	Amylose																			
ژلاتینه شدن	Gelatinization																			
پروتئین	Protine																			

کنترل صفت پروتئین هم در شرایط نرمال و هم در شرایط تنش می‌باشند که آلی RM587-B بیشترین اثر و آلی RM589-C کمترین اثر را دارا است. در پژوهشی به‌منظور بررسی ساختار ژنتیکی و مکان‌یابی ژن‌های کنترل‌کننده خصوصیات ظاهری دانه برنج، از ۹۶ لاین اینبرد نو ترکیب استفاده شد. مکان‌یابی فاصله‌ای مرکب بر روی صفات کیفی ظاهری برنج، تعداد ۱۳ QTL برای هشت صفت شناسایی شد. برای طول و عرض برنج سفید، به ترتیب سه و یک QTL شکل دانه خام و پخته‌شده به ترتیب دو و سه QTL و برای طول و عرض برنج پخته‌شده به ترتیب سه و یک QTL شناسایی شد (Sabouri et al., 2015).

نتیجه‌گیری نهایی

در تجزیه به مختصات اصلی نشانگرهای SSR مرتبط با خشکی ۱۰ مؤلفه توانستند ۵۵/۵۸ درصد از تغییرات را توجیه نمایند. اولین مؤلفه ۹/۷۳۳۲ درصد از تغییرات را توجیه می‌کند. آغازگرهای استفاده‌شده برای آنالیز تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های مختلف برنج در مجموع توانستند وجود ۵۴ آلی چند شکل را نشان دهند که بیشترین تعداد مربوط به RM333 و RM589 با ۷ آلی بود.

نتایج محتوی اطلاعات چند شکل (PIC) بالاترین مقدار را در نشانگر RM589 و کمترین مقدار را در نشانگر RM217 نشان می‌دهد. نتایج تجزیه ارتباط نشان داد که بیشتر آلی‌ها هم در شرایط غرقاب و هم در شرایط تنش خشکی در سطح احتمال ۱ درصد معنادار می‌باشند و هم‌چنین آلی RM587-B برای صفت میزان پروتئین هم در شرایط نرمال هم در شرایط تنش خشکی مشترک است.

قدردانی

بدینوسیله از موسسه بین‌المللی تحقیقات برنج، معاونت علمی و فناوری ریاست جمهوری و دانشگاه گنبد کاووس جهت حمایت‌های مالی و معنوی تشکر می‌گردد.

شناسایی نشانگرهای تأثیرگذار بر صفات موردبررسی در شرایط نرمال و تنش خشکی

نتایج حاصل از بررسی تجزیه ارتباطی (جداول ۶ و ۷) بین صفات اندازه‌گیری شده با نشانگرهای به‌کاررفته در آزمایش است. از میان ۱۰۴ آلی مؤثر بر صفات مورد ارزیابی، از نظر تأثیرگذاری آلی RM6349-D با ضریب تبیین ۹/۹۲ بیشترین اثر را روی صفت محیط دانه برنج قهوه‌ای داشت. صفت محیط دانه برنج قهوه‌ای هشت آلی، صفت قطر معادل دانه برنج قهوه‌ای هفت آلی، صفت طول دانه برنج قهوه‌ای و مساحت دانه برنج قهوه‌ای هر دو با شش آلی تحت تأثیر است. درجه حرارت ژلاتینه شدن در شرایط نرمال تحت تأثیر سه آلی است و دو صفت مقدار آمیلوز و میزان پروتئین هر دو تحت تأثیر دو آلی می‌باشد. آلی RM587-B کنترل‌کننده دو صفت درجه حرارت ژلاتینه شدن و میزان پروتئین در شرایط نرمال است و در سطح یک درصد معنی‌دار می‌باشد. در میان صفات مرتبط با کیفیت دانه برنج در شرایط نرمال آلی RM587-B در کنترل دو صفت درجه حرارت ژلاتینه و میزان پروتئین مؤثر بود. از نظر میزان اثرگذاری آلی‌ها بر روی صفات موردبررسی در شرایط نرمال، آلی RM6349-D با ۹/۹۲ درصد توجیه برای محیط دانه برنج قهوه‌ای دارای بیشترین اثرگذاری بر روی صفات در بین تمامی آلی‌ها بود. بعدازآن آلی RM587-B با ۹/۷۹ درصد تأثیر برای طول دانه برنج قهوه‌ای و آلی RM5558-C با ۹/۸۱ تأثیر برای صفت محیط دانه برنج قهوه‌ای بیشترین تأثیرات را بر روی صفات بررسی‌شده داشتند.

از نظر میزان اثرگذاری آلی‌ها بر روی صفات موردبررسی در شرایط خشکی آلی RM587-A با ۹/۶۴ درصد برای صفت عرض دانه سفید شده بیشترین اثرات را بر روی صفات موردبررسی داشتند. درجه حرارت ژلاتینه شدن تحت تأثیر چهار آلی است که در بین آن‌ها آلی RM5558-A با ۸/۰۱ درصد بیشترین و آلی RM5642-E با ۲/۶۷۰ درصد کمترین اثر را دارا می‌باشد. آلی‌های RM587-B و RM589-C برای

جدول ۶. نتایج تجزیه ارتباطی بین نشانگرهای SSR و صفات مختلف اندازه‌گیری شده در شرایط نرمال

Table 6. Results of the analysis of the relationship between SSR markers and different traits measured in normal conditions

صفات Trait	عرض از مبدأ Intercept	آلل Allele	ضریب رگرسیون B	خطای استاندارد STD.Error	آماره F	ضریب تبیین R ²
میزان آمیلوز Amylose content	22.404	RM333 -B	2.617**	0.722	4.54*	2.11
		RM587 -A	-2.862**	0.858	9.18**	5.34
میزان پروتئین Protein content	20.018	RM589 -C	8.085**	1.779	9.480**	3.58
		RM587 -B	-11.119**	3.703	11.483**	5.89
درجه حرارت ژلاتینه شدن Gelatinization temperature	2.632	RM587 -B	1.968**	0.385	11.69**	4.55
		RM333 -A	1.784**	0.548	11.12**	6.31
		RM1161 -B	1.056*	0.459	11.62**	7.44
		RM333 -D	-0.286**	1.870	5.79**	2.66
		RM6349 -A	5.697**	0.704	8.10**	5.19
مساحت دانه برنج قهوه‌ای Grain area of brown rice	27.612	RM587 -C	4.558**	0.966	8.63**	6.49
		RM5558 -C	7.177**	0.376	10.26**	7.60
		RM6349 -C	-2.216**	0.821	15.68**	8.67
		RM589 -D	1.971*	0.746	20.74**	9.19
		RM217 -A	-1.126**	0.164	28.34**	6.39
		RM333 -C	-1.016**	0.095	37.57**	8.34
طول دانه برنج قهوه‌ای Grain length of brown rice	11.184	RM3370 -B	-0.335**	0.071	40.31**	8.96
		RM5642 -E	0.395**	0.092	44.79**	9.32
		RM484 -A	0.423**	0.112	67.98**	9.66
		RM587 -B	0.253*	0.095	86.70**	9.79
خروج از مرکز Eccentricity	0.935	RM217 -A	-0.045*	0.013	12.77**	4.44
		RM5642 -D	0.088**	0.164	5.32*	2.50
		RM3498 -A	0.644**	0.070	7.67**	5.06
قطر معادل دانه برنج قهوه‌ای Equilibrium grain balance of brown rice	5.856	RM587 -C	0.329**	0.081	8.32**	6.41
		RM5558 -C	0.534**	0.108	9.88**	7.53
		RM589 -D	0.310**	0.064	15.27**	8.64
		RM217 -C	-0.362*	0.116	20.35**	9.17
		RM1161 -B	-0.184*	0.081	24.69**	9.45
		RM217 -A	-3.357**	0.237	18.28**	5.33
		RM333 -C	-1.879**	0.200	19.31**	7.20
محیط دانه برنج قهوه‌ای Grain circumference of brown rice	26.167	RM6349 -A	-4.507**	0.328	25.34**	8.45
		RM333 -A	2.109**	0.222	36.89**	9.19
		RM3498 -A	0.834**	0.145	47.49**	9.52
		RM5558 -D	0.834**	0.152	58.20**	9.69
		RM5558 -C	0.940**	0.206	71.93**	9.81
		RM6349 -D	0.634**	0.174	141.66**	9.92
		RM484 -C	4.585**	1.007	7.01*	3.18
مساحت دانه سفید شده Grain area of White rice	21.745	RM5558 -B	-3.716**	0.047	6.85**	4.95
		RM5642 -E	2.837*	1.159	8.20**	6.54
		RM484 -A	-1.258*	0.142	21.30**	5.87
طول دانه سفید شده Grain length of white rice	8.907	RM333 -C	-0.470**	0.120	27.18**	7.95
		RM3498 -A	0.513**	0.134	28.56**	8.68
		RM589 -C	0.408*	0.165	31.42**	9.13
عرض دانه سفید شده Grain width of white rice	3.487	RM1161 -B	-0.441*	0.174	6.40*	2.99
خروج از مرکز Eccentricity	0.915	RM217 -A	-0.073**	0.012	24.08**	6.16
		RM3370 -A	0.027*	0.012	17.55**	7.15
قطر معادل دانه سفید Equilibrium grain balance of white rice	5.245	RM484 -C	0.542**	0.123	6.99*	3.18
		RM5558 -B	-0.434**	0.128	6.68**	4.88
		RM5642 -E	0.330*	0.141	7.68**	6.39
محیط دانه سفید White grain circumference of white rice	22.229	RM3370 -C	2.431**	0.380	17.01**	5.31
		RM484 -C	1.159*	0.384	17.17**	7.10
		RM6349 -D	-0.943*	0.333	19.87**	8.21

* و ** معنی‌دار بودن در سطح احتمال ۱ و ۵ درصد

* and ** significant at 5% and 1% probability levels respectively

جدول ۷. نتایج تجزیه ارتباط بین نشانگرهای SSR و صفات مختلف اندازه‌گیری شده در شرایط تنش خشکی

Table 7. Results of the analysis of the relationship SSR markers and different traits measured in drought stress

صفات Trait	عرض از مبدأ Intercept	آل Allele	ضریب رگرسیون B	خطای استاندارد STD.Error	آماره F	ضریب تبیین R ²
درجه حرارت ژلاتینه شدن Gelatinization temperature	4.350	RM5642 -E	1.600**	0.360	4.96*	2.76
		RM484 -A	-2.950**	0.657	5.79*	4.91
		RM217 -A	2.600*	0.905	7.74**	6.79
میزان پروتئین Protein content	13.087	RM5558 -A	-1.550*	0.623	10.09**	8.01
		RM589 -C	5.270**	1.266	7.373*	3.03
		RM587 -B	-8.031**	2.634	10.131**	5.59
مساحت دانه برنج قهوه‌ای Grain area of brown rice	26.737	RM5558-C	5.609**	0.878	14.47**	4.60
		RM5642-E	-2.967***	0.613	13.14**	6.22
		RM3498-A	3.156**	0.672	15.55**	7.57
طول دانه برنج قهوه‌ای Grain length of brown rice	10.139	RM484-D	3.230*	1.176	18.22**	8.39
		RM587-A	-2.087*	0.910	20.07**	8.85
		RM5642-E	-1.189**	0.308	7.17*	2.97
عرض دانه برنج قهوه‌ای Grain width of brown rice	3.537	RM333-A	1.195**	0.344	6.96**	5.99
		RM589-E	-0.340**	0.106	8.43***	3.32
		RM1161-D	0.283*	0.118	8.22**	5.07
خروج از مرکز Eccentricity	0.939	RM217-A	-0.061**	0.011	18.87**	5.26
		RM3370-A	0.029*	0.011	16.07**	6.76
		RM5558-C	0.587*	0.097	13.12**	4.36
قطر معادل دانه برنج قهوه‌ای Equilibrium grain balance of brown rice	5.820	RM5642-E	-0.330**	0.068	12.31**	6.06
		RM3498-A	0.350**	0.074	14.95**	7.49
		RM484-D	0.349*	0.130	17.31**	8.32
محیط دانه برنج قهوه‌ای Grain circumference of brown rice	22.901	RM587-A	-0.230*	0.101	19.10**	8.80
		RM217-C	4.441**	0.784	5.60*	2.48
		RM3370-C	1.145*	0.399	7.92**	4.98
مساحت دانه برنج سفید Grain area of white rice	16.951	RM3498-D	2.714**	0.603	9.96**	6.66
		RM484-B	1.224**	0.376	14.89**	8.10
		RM589 -C	4.611**	0.479	10.44**	3.81
طول دانه سفید شده Grain length of white rice	8.792	RM3498 -A	2.051**	0.479	10.74**	5.73
		RM5642 -D	3.890**	0.764	16.53**	7.68
		RM6349 -A	-3.058**	0.841	22.81**	8.67
عرض دانه سفید شده Grain width of white rice	2.969	RM1161 -A	1.829*	0.841	24.05**	9.20
		RM3370 -B	-0.866**	0.138	16.58**	4.94
		RM217 -A	-1.142**	0.232	14.03**	6.37
خروج از مرکز Eccentricity	0.915	RM589 -E	-0.569**	0.147	14.75**	7.47
		RM3498 -C	-0.461*	0.167	18.19**	8.39
		RM484-A	0.473**	0.040	13.19**	4.37
قطر معادل دانه سفید Equilibrium grain balance of white rice	4.632	RM5558-C	0.388**	0.044	21.23**	7.26
		RM5642-C	0.175**	0.034	27.30**	8.45
		RM6349-A	-0.448**	0.089	30.43**	8.97
محیط دانه سفید شده White grain circumference of white rice	21.462	RM5558-A	0.227**	0.059	37.74**	9.36
		RM587-A	0.180*	0.059	53.13**	9.64
		RM484-A	-0.052**	0.004	26.45**	6.09
خروج از مرکز Eccentricity	0.915	RM333-A	0.036**	0.005	25.23**	7.59
		RM589-A	0.022**	0.004	28.01**	8.49
		RM558-A	-0.030**	0.007	32.07**	9.02
قطر معادل دانه سفید Equilibrium grain balance of white rice	4.632	RM484-D	-0.028**	0.008	36.67**	9.34
		RM1161-C	0.008*	0.003	41.83**	9.54
		RM589-C	0.593**	0.075	10.08**	3.72
محیط دانه سفید شده White grain circumference of white rice	21.462	RM3498-A	0.331**	0.067	10.56**	5.69
		RM5642-D	0.08**	0.119	16.06**	7.63
		RM6349-A	-0.380*	0.131	20.13**	8.52
محیط دانه سفید شده White grain circumference of white rice	21.462	RM5642-C	1.828*	0.093	1.828*	3.73
		RM3370-C	2.396*	0.836	2.396*	5.25
		RM6349-D	-1.977*	0.843	-1.977*	6.52

منابع

- Chakravarthi, B., Naravaneni, R., 2006. SSR marker-based DNA fingerprinting and diversity study in rice (*Oryza sativa* L). African Journal of Biotechnology. 5(9), 689-688.
- Dash, S.K., Singh, J., Tripathy, M., Mishra, D., 1996. Association of quantitative traits and path analysis in medium landrice. Environment and Ecology. 14, 99-102.
- Davis, J.E., 1986. Statistic and Data Analysis in Geology. John Wiley & Sons Inc., New York.
- Derierwala, A.P., Ramakrishna, W., Ranjekar, P.H., Gupta, V.S., 2000. Sequence variations at a complex microsatellite locus in rice and its conservation in cereals. Theoretical and Applied Genetics. 101, 323-341
- Gholizadeh R., 2015. Allelic diversity for continuous markers to QTLs related to drought tolerance in rice. MSc dissertation, Faculty of Agriculture Science and Natural Resources, Gonbad Kavoud University. [In Persian].
- Gholizadeh R., Sabouri, H., Ali Rahemi, A., Fallahi, H.A., Rezaei, M., 2019. Identification of alleles related to rice traits using association analysis and haplotyping under normal and drought stress. Environmental Stresses in Crop Science. 12(4), 1003-1016. [In Persian with English Summary].
- Honarvar, F., Sabouri, H., Dadras, A.R., 2016. Study of Genetic Diversity of Rice Genotypes by SSR Markers and Association Analysis for Related Traits to Cold Tolerance. Journal of Crop Breeding. 8 (17), 173-166.
- Juliano, B. O., 1985. Criteria and tests for rice grain qualities. In: Juliano, B.O. (Ed.) Rice chemistry and technology. American Association of Cereal Chemists, St. Paul, Minnesota, USA.
- Little, R. R., Hilder, G. B., Dawson, E. H., 1958. Differential effect of dilute alkali on 25 varieties of milled white rice. Cereal Chemistry. 35, 111-126.
- Liu, K., Muse, S. V. 2005. PowerMarker: an integrated analysis environment for genetic marker analysis. Bioinformatics. 21(9), 2128-9.
- Rabbani, M.A., Masood, M.S., Shinwari, Z.K., Shinozaki, K.Y., 2010. Genetic analysis of basmati and non-basmati Pakistani rice (*Oryza sativa* L.) cultivars using microsatellite markers. Pakistan Journal of Botany. 42, 2551-2564.
- Rezaei M., 2017. Study of allelic and haplotype variation of QTLs related to drought tolerance and soil acidity in barley plants. MSc thesis. Faculty of Agriculture Science and Natural Resources, Gonbad Kavoud University. [In Persian].
- Rezaei, M., Sabouri, H., Gholizadeh, A., Mohammadi, R., 2019. Allelic variation, association analysis and haplotype diversity of microsatellite markers related to drought tolerance QTLs in barley. Environmental Stresses in Crop Sciences. 12(1), 45-54. [In Persian with English Summary].
- Mohammadsalehi, M. H. 1989. Introduction to laboratory techniques of rice quality determination. Guilan Agricultural and Natural Resources Research Center. Rasht Rice Research Institute.
- Mohammadinezhad, G., Singh, R. K., Arzani, A., Rezaei, A. M., Sabouri, H., Gregorio, G. B. 2010. Evaluation of salinity tolerance in rice genotypes. International Journal of Plant Production. 4(3), 199-207.
- Naghavi, M. R., Ghareyazi, B., Salekdeh, G. H. 2015. Molecular Markers. Tehran University Press. 340pp [In Persian].
- Sabouri, H., Hosseini, S. M., 2017. Botany, Yield Physiology and Breeding of Rice. Norouzi publishing and Gonbad Kavoud University. 553pp. [In Persian].
- Sabouri, A., Sabouri, H., Dadras, A., 2013. Association analysis of closely linked markers to major QTLs saltol and SKCI and Salt tolerance – related traits in rice varieties. Cereal Research. 3(1), 2013(53-68). [In Persian with English Summary].
- Sabouri, H., Dadras, A.R., Sabouri, A., Katouzi M., 2015. Molecular genetic analysis of rice grain dimension in recombinant inbred lines of cross of Anbarbu×Sepidroud. Agricultural Biotechnology Journal. 7(2), 21-28. [In Persian with English Summary].
- Saghai Maroof, M.A., Biyaoshev, R.M., Yang, G.P., Zhang, Q., Allard, R.W., 1994 Extraordinarily polymorphic microsatellites DNA in barley species diversity, chromosomal location, and population dynamics. Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America 91:5466-5470.
- Second, G., 1991. Molecular markers in rice systematics and the evaluation of genetic

- resources. In Bajaja, Y.P.S. (ed.), *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, vol 14. Springer, Berlin, Heidelberg.
- Sarayloo, M., Sabouri, H., Dadras, A. R., 2015. Assessing genetic diversity of rice genotypes using microsatellite markers and their relationship with morphological characteristics of seedling stage under non- and drought-stress conditions. *Cereal Research*. 5(1), 1-15.
- Tavalla, R., Aalami, A., Sabouri, H., 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(2), 107-119. [In Persian with English Summary].
- Tavalla, R., 2013. Haplotype diversity at QTLs related to drought tolerance on chromosome 9 of rice (*Oryza Sativa* L). MSc dissertation, Faculty of Guilan University. [In Persian].
- Zhu, H., Xie, Z., Ge. S., 2003. Microsatellite analysis of genetic diversity and population genetic structure of a wild rice (*Oryza rufipogon* Griff.) in China. *Theoretical and Applied Genetics*. 107, 332339.
- Zhu, J., Galem M. D., Guarrie, S., 1998. AFLP markers for the study of rice biodiversity. *Theoretical and Applied Genetics*. 96, 602-611.



Original article

Allel variation for markers related to physical and chemical quality of rice under flood and drought stress conditions

S. Miri¹, H. Sabouri^{2*}, A.A. Ebadi³, S. J. Sajadi⁴

1. MSc in Biotechnology in Agriculture, Department of Plant Production, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Gonbad Kavous, Iran

2. Associate Professor, Department of Plant Production, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Gonbad Kavous University, Iran

3. Assistant Professor, Rice Research Institute of Iran, Iranian Agricultural Research, Rasht, Iran

4. Assistant Professor, Department of Plant Production, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Gonbad Kavous University, Iran

Received 14 December 2018; Accepted 10 April 2019

Abstract

The main source of rice is more than half the world's population and plays an important role in feeding this population. Because, grain rice is consumed, its quality is of particular importance. In order to study the physical and chemical quality of rice grain, 90 rice genotypes were planted under normal conditions and drought stress in the Gonbad-e-Kavous University research farm at 2015-2016. In this research, grain length, grain width, grain size, grain size, Equilibrium grain balance, Eccentricity, circumference, amylose content, protein percentage and gelatinization temperature were measured. The result of microsatellite markers indicate that there were 54 multivariate alleles and also an average of 4.9 alleles per marker, with the highest number of RM333 and RM589 markers with 7 alleles. The analysis of the principle coordinates of the SSR markers showed that the first 10 components were able to explanation 55.58 percent of the variation. The determination of the band pattern of the genotypes showed that under normal conditions for genotypes, 216L, IR59673-93-2-3 and AZUCENA.BALA.225 genotypes had the highest amylose content (25.8%, 25.2 and 24.5% respectively). The results of the analysis of the relationship between the traits measured with the markers used in this experiment showed that among the 104 effective alleles to evaluate the traits, the gelatinization temperature under normal conditions was affected by three alleles and amylose and protein content are both affected by two alleles. The RM587-B allele controls both the gelatinization temperature and the protein content in normal conditions and is significant at 1% level. Among the traits related to rice quality in normal conditions, the RM587-B allele was effective in controlling the gelatinization temperature and protein content. According to the results obtained from this assessment, these traits can be used in breeding programs.

Keywords: Allele diversity, Association analysis, Quality, Rice, SSR markers