



دانشگاه گیلان
دانشکده علوم کشاورزی

تحقیقات غلات

دوره پنجم/ شماره اول/ بهار ۱۳۹۴ (۱-۱۵)

بررسی تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های برنج با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره و ارتباط آنها با صفات مرفولوژیک مرحله گیاهچه‌ای تحت شرایط نرمال و تنش خشکی

محمد سرایلو^۱، حسین صبوری^{۲*} و احمد رضا دادرس^۳

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد دانشگاه آزاد اسلامی واحد دامغان، ۲- دانشیار گروه تولیدات گیاهی دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه گنبد کاووس، ۳- دانشجوی دکتری گروه زراعت و اصلاح نباتات دانشکده علوم کشاورزی دانشگاه گیلان

(تاریخ دریافت: ۹۲/۹/۱۲- تاریخ پذیرش: ۹۳/۶/۲۴)

چکیده

انتخاب به کمک نشانگر، یکی از مهم‌ترین کاربردهای نشانگرهای مولکولی به ویژه در راستای ایجاد ژنوتیپ‌های متحمل به تنش‌های محیطی در گیاهان زراعی است. در این پژوهش، گیاهچه‌های ۲۲ ژنوتیپ برنج تحت دو شرایط کشت (نرمال و تنش خشکی حاصل از مانیتول) در قالب یک آزمایش فاکتوریل با طرح پایه کاملاً تصادفی با سه تکرار در اطاقک رشد دانشکده کشاورزی دانشگاه گنبد کاووس در سال ۱۳۹۱ ارزیابی و صفات طول و وزن خشک ریشه و اندام هوایی اندازه‌گیری شدند. نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که برهمکنش ژنوتیپ×شرایط کشت برای تمامی صفات اندازه‌گیری شده معنی‌دار بود. این نتیجه نشان دهنده واکنش متفاوت ژنوتیپ‌ها در دو شرایط کشت و نیز وجود تنوع ژنتیکی بین ژنوتیپ‌های مورد بررسی برای صفات ارزیابی شده در مرحله گیاهچه‌ای بود. برای بررسی تنوع مولکولی بین ژنوتیپ‌ها، DNA ژنومی نمونه‌ها استخراج و توسط ۲۲ جفت آغازگر ریزماهواره پیوسته با صفات مقاومت به خشکی تکثیر شد. در مجموع، تعداد ۱۰۶ آلل مشاهده شد که تعداد آلل‌های مشاهده شده در هر جایگاه از ۲ تا ۷ آلل متغیر و متوسط آن ۴/۸۲ آلل بود. محتوای اطلاعات چندشکل (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 ریزماهواره، ژنوتیپ‌های مورد مطالعه را در دو گروه قرار داد. نتایج تجزیه به مختصات اصلی نشان داد که ده مولفه اول در مجموع ۹۸/۵۱ درصد از تنوع کل جمعیت را توجیه می‌کنند. گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها بر اساس دو مولفه اول آنها را در چهار گروه قرار داد. نتایج این گروه‌بندی‌ها بیانگر مناسب بودن نشانگرهای ریزماهواره برای نشان دادن تنوع ژنتیکی بین ژنوتیپ‌های برنج بود. به منظور شناسایی نشانگرهای آگاهی‌بخش موثر بر صفات مرفولوژیک از تجزیه رگرسیون استفاده شد و در مجموع شانزده نشانگر آگاهی‌بخش در هر دو شرایط کشت شناسایی شدند که پیشنهاد می‌شود از این نشانگرها در برنامه‌های به‌نژادی تحمل به خشکی استفاده شود.

واژه‌های کلیدی: برنج، کمبود آب، نشانگر آگاهی‌بخش، SSR، QTL

* نویسنده مسئول: hossein.sabouri@ghec.ac.ir

مقدمه

برنج، به عنوان یکی از مهم‌ترین محصولات زراعی دنیا، در بخش‌های وسیعی از سراسر جهان کشت می‌شود و غذای اصلی بیش از نیمی از مردم جهان است (Park et al., 2014). خشکی از عمده خطرات جدی برای تولید موفق محصولات زراعی به ویژه برنج در جهان است که می‌تواند در هر زمان طی فصل رشد رخ دهد. از این‌رو، یکی از چالش‌های اصلی در کشاورزی تولید غذای بیشتر با آب کمتر است (Tuyen and Prasad, 2008). یکی از یافته‌های مهم طی چند دهه گذشته در زمینه اصلاح نباتات، شناخت وجود سرمایه عظیم تنوع ژنتیکی در گیاهان بوده است، اما تا کنون بشر فقط توانسته است یک گام مقدماتی برای شناسایی پتانسیل وسیع آن بردارد (Von Braun and Virchow, 1996). برای استفاده مناسب از این سرمایه عظیم، اطلاع از ماهیت و میزان تنوع موجود در ژرم‌پلاسم، از اهمیت زیادی در برنامه‌های به‌نژادی برخوردار است. والدینی که از لحاظ ژنتیکی متفاوت هستند، هیبریدهای با هتروزیس بیشتر تولید می‌کنند و احتمال وجود تفرق یافته برتر را افزایش می‌دهد. از طرف دیگر، تعیین مشخصات و گروه‌بندی ژرم‌پلاسم به به‌نژادگران امکان می‌دهد تا از دوباره کاری در نمونه‌گیری از یک جمعیت خودداری نمایند (Soroush et al., 2005). موفقیت هر به‌نژادگر به تعیین تنوع ژنتیکی و استفاده از آن در برنامه‌های به‌نژادی بستگی دارد و از این‌رو ضروری است تنوع موجود در جمعیت مورد مطالعه، به دقت بررسی و از آن استفاده شود (Aghazadeh et al., 2004).

آلوارز و همکاران (Alvarez et al., 2007) به ارزیابی تنوع ژنتیکی واریته‌های بومی و اصلاح شده و همچنین برقراری ارتباط ژنتیکی بین آنها پرداختند و بیشترین هتروزیگوسیتی را در واریته‌های بومی (نسبت به واریته‌های اصلاح شده) شناسایی کردند. تجزیه خوشه‌ای، ژنوتیپ‌های مورد مطالعه را در سه گروه مختلف مطابق با منشأ آنها قرار داد. تخمین ارتباطات ژنتیکی نیز بر اساس نسبت جایگاه ریزماهواره دارای آلل مشترک نشان داده شد. گانش رام و همکاران (Ganesh Ram et al., 2007) تنوع ژنتیکی بین ۳۵ ژنوتیپ برنج شامل ۱۹ توده، ۹ رقم و ۷ فامیل وحشی را با نشانگرهای ریزماهواره موجود در سراسر ژنوم بررسی و سپس با تجزیه خوشه‌ای

بر اساس تنوع آللی ریزماهواره‌ها توانستند تفاوت بین توده‌ها، رقم‌ها و فامیل‌های وحشی را شناسایی و آنها را در گروه‌های مختلف طبقه‌بندی کنند. تنوع آللی محاسبه شده در خوشه‌ها نشان داد که بیشترین تنوع ژنتیکی در فامیل‌های وحشی (۰/۴۳۶) و به دنبال آن در توده‌ها (۰/۳۶۵) بود و رقم‌ها کمترین تنوع را داشتند. با توجه به تنوع ژنتیکی بسیار بالای شناسایی شده با نشانگرهای ریزماهواره و الگوی تنوع ژنتیکی، استفاده از ژن‌های مفید توده‌ها، رقم‌ها و فامیل‌های دور وحشی برنج برای بهبود ارقام پیشنهاد شد. صفائی چائی‌کار و همکاران (Safaei Chaeikar et al., 2008) به منظور بررسی تحمل ژنوتیپ‌های برنج به تنش خشکی انتهای فصل، ۴۹ ژنوتیپ برنج ایرانی و خارجی را در دو محیط بدون تنش و تنش خشکی ارزیابی کردند. نتایج این پژوهش نشان داد که در هر دو شرایط بدون تنش و تنش خشکی، بیشترین عملکرد شلتوک متعلق به رقم نعمت به ترتیب با مقدار ۷/۳۱ و ۷/۰۱ تن در هکتار بود. در مقابل، کمترین عملکرد شلتوک در محیط بدون تنش متعلق به رقم دم‌سفید با عملکرد ۲/۷۴ تن در هکتار و در محیط تنش خشکی متعلق به رقم Diwani با عملکرد ۱/۴۶ تن در هکتار بود. این محققین اظهار داشتند که رقم نعمت از نظر اجزای عملکرد در دو محیط وضعیت مطلوبی داشت.

گریشما شاه و همکاران (Grishma Shah et al., 2012) به ارزیابی تنوع ژنتیکی ۲۲ ژنوتیپ از لاین‌های بک‌کراس، نگهدارنده و نرعیقیم با استفاده از نشانگر ریزماهواره پرداختند. در میان ۳۰ نشانگر ریزماهواره استفاده شده، ۲۵ نشانگر چندشکل بودند و ۲۳۱ آلل چندشکل تولید کردند. آنها بیان داشتند نشانگر ریزماهواره ابزاری کارآمد برای شناسایی تنوع ژنتیکی و تمایز بین افراد می‌باشد. کومار و همکاران (Kumar et al., 2012) تنوع ژنتیکی ۶۴ ژنوتیپ برنج را با استفاده از ۲۰ آغازگر ریزماهواره مربوط به کروموزوم‌های ۷ و ۱۲ بررسی کردند. نتایج به دست آمده نشان داد که از ۲۰ آغازگر، هشت آغازگر چندشکل بودند. تجزیه و تحلیل خوشه‌ای، سطح بالایی از تنوع ژنتیکی را در بین ژنوتیپ‌ها نشان داد و آنها را در گروه‌های مجزا قرار داد. یاسمین و همکاران (Yasmin et al., 2012) تنوع ژنتیکی ۲۴ ژنوتیپ برنج شامل ۵ رقم متحمل به شوری، ۹ رقم پرمحصول و

باز (RM26360) بود. در مجموع ۱۶۸ آلل مشاهده شد و تعداد آلل‌ها در هر نشانگر از ۲ تا ۶ آلل متغیر بود. مقدار PIC نیز بین ۰/۲۱ (RM 252) تا ۰/۷۶ (S07024) محاسبه شد. امینی نسب و همکاران (Amini Nasab et al., 2012) نیز تنوع ژنتیکی ۲۰ رقم برنج ایرانی را با استفاده از ۱۹ نشانگر ریزماهواره پیوسته با ژن‌های کنترل کننده تحمل به خشکی و نیز بر اساس شاخص مقاومت به خشکی، در دو محیط (تحت خشکی و بدون تنش آبی) مورد بررسی قرار دادند. نتایج تجزیه واریانس مرکب نشان داد که بین ژنوتیپ‌ها از لحاظ عملکرد دانه و اجزای آن و نیز شاخص مقاومت به خشکی اختلاف معنی‌داری وجود داشت. تمامی ۱۹ نشانگر ریزماهواره در ۲۰ ژنوتیپ مورد مطالعه، چندشکل بودند. در مجموع، ۱۴۲ آلل با میانگین ۷/۷۴ آلل در هر نشانگر مشاهده شد و میانگین PIC نیز ۰/۸۱۷ بود. تجزیه خوشه‌ای بر اساس داده‌های مولکولی با استفاده از ضریب تشابه جاکارد و الگوریتم UPGMA، ژنوتیپ‌ها را در شش دسته تقسیم کرد و تجزیه به مختصات اصلی، صحت این گروه‌بندی را مورد تایید قرار داد.

هدف از اجرای این تحقیق، ارزیابی تنوع مولکولی و مرفولوژیک بین تعدادی از ژنوتیپ‌های برنج تحت شرایط نرمال و تنش خشکی در مرحله گیاهچه‌ای، بررسی رابطه بین تنوع مرفولوژیک و مولکولی و شناسایی نشانگرهای آگاهی‌بخش هر یک از صفات مورد مطالعه بود.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق، ۲۲ ژنوتیپ برنج (جدول ۱) شامل ارقام بومی و اصلاح شده داخلی و وارداتی ارزیابی شدند. ژنوتیپ‌ها به نحوی انتخاب شدند که نماینده خوبی از گروه خود (بومی، اصلاح شده داخلی و وارداتی) باشند. مرحله فنوتیپی آزمایش به روش گریگوریو و همکاران (Gregario et al., 1993) در اتاقک رشد آزمایشگاه اصلاح نباتات دانشکده کشاورزی دانشگاه گنبد کاووس در سال ۱۳۹۱ انجام شد. بذرها به مدت ۲۰ ثانیه با محلول ۵ درصد هیپوکلریت سدیم ضد عفونی و پس از شستشو با آب مقطر استریل به ظروف پتری حاوی کاغذ صافی منتقل شدند. مقدار کمی آب مقطر استریل به ظروف اضافه شد تا کاغذ صافی و بذرها کاملاً مرطوب و خیس شوند. در روز سوم، بذرها جوانه زده به سینی‌های حاوی

۱۰ واریته هیبرید برنج را با ۱۰۰ نشانگر ریزماهواره مورد تجزیه و تحلیل قرار دادند. تجزیه خوشه‌ای به وضوح ژنوتیپ‌ها را در پنج خوشه متفاوت تقسیم کرد. چهار خوشه شامل واریته‌های اینبرد و یک خوشه مربوط به واریته‌های هیبرید بود.

تشخیص تفاوت بین ژنوتیپ‌ها با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره، با دقت بیشتری ارتباط و تنوع ژنتیکی بین ژنوتیپ‌ها را ارزیابی می‌کند. صبوری و همکاران (Sabouri et al., 2011) جهت شناسایی ارقام برنج متحمل به تنش خشکی، ۲۱ رقم را در دو محیط نرمال و تنش خشکی در منطقه گنبد مورد ارزیابی قرار دادند. نتایج بررسی آنها نشان داد که ارقام IRAT216 و CAIAPPO بیشترین عملکرد شلتوک را در هر دو محیط تحت تنش خشکی (به ترتیب ۳/۶۴۷۵ و ۳/۴۹۳۳ تن در هکتار) و نرمال (به ترتیب ۶/۰۹۵ و ۶/۳۳ تن در هکتار) داشتند و رقم DINORADO نیز با میانگین عملکرد ۸/۳۳ تن در هکتار در هر دو محیط، کمترین عملکرد را داشت. این محققین عنوان کردند که تغییر شرایط محیطی، تغییرات قابل ملاحظه و بسیار معنی‌داری روی صفات ارقام مورد مطالعه ایجاد کرد. پروایز و همکاران (Pervaiz et al., 2010) به اندازه‌گیری تنوع ژنتیکی بین ۷۵ ژنوتیپ برنج پاکستان با استفاده از ۳۵ نشانگر ریزماهواره و تاثیر آن روی صفات زراعی پرداختند. از بین نشانگرهای مطالعه شده، ۳۲ نشانگر در مجموع ۱۴۲ آلل چندشکل تولید کردند، در حالی که ۳۰ نشانگر یک‌شکل (مونومورف) بودند. تعداد آلل‌های تولید شده توسط هر نشانگر از ۲ تا ۱۳ آلل متغیر بود و به طور متوسط ۴/۴ آلل برای هر جایگاه مشاهده شد. محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC) از ۰/۱۲۴ تا ۰/۸۳۶ و میانگین آن ۰/۵۶۹ بود. دندروگرام تجزیه خوشه‌ای از ناحیه میزان ضریب تشابه ژنتیکی ۰/۴، ژنوتیپ‌ها را در چهار گروه تقسیم کرد. فریدول اسلام و همکاران (Faridul Islam et al., 2012) نیز تنوع ژنتیکی ۱۴ ژنوتیپ برنج شامل شش ژنوتیپ مقاوم به شوری، سه ژنوتیپ متحمل به شوری، دو ژنوتیپ مقاوم به خشکی و سه ژنوتیپ پرمحصول را با استفاده از ۴۰ نشانگر ریزماهواره مورد بررسی قرار دادند. همه نشانگرهای ریزماهواره استفاده شده در بین ۱۴ ژنوتیپ برنج چندشکلی نشان دادند. اندازه نشانگرها بین ۷۵ جفت باز (RM436) تا ۳۳۰ جفت

شبکه‌های نایلونی انتقال داده شدند و در هر سوراخ ۳ عدد بذر جوانه زده قرار گرفت و سپس محلول غذایی یوشیدا (Yoshida, 1981) به سینی‌ها اضافه شد. گیاهچه‌های برنج به مدت ۱۴ روز در دو شرایط کشت (محلول غذایی نرمال و حاوی مانیتول ۸- بار) رشد کردند. پس از آن از هر محیط به طور جداگانه و در مرحله ۲ تا ۳ برگه نمونه-برداری صورت گرفت. طول ریشه و طول اندام هوایی، وزن خشک ریشه و اندام هوایی اندازه‌گیری شد (Rabiei et al., 2013). اندازه‌گیری صفات روی ۱۰ نمونه انجام گرفت و در نهایت از میانگین آنها استفاده شد. نمونه‌های برگه در اوایل صبح از ۲۲ ژنوتیپ برنج به‌طور جداگانه جمع‌آوری شدند و برگ‌های هر نمونه درون کیسه‌های نایلونی همراه با اسم ژنوتیپ بسته‌بندی و بلافاصله درون

ظرف یخ نگهداری شدند و سپس به آزمایشگاه منتقل و در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. در مرحله بعد DNA ژنومی آنها به روش سقای معروف و همکاران (Saghai Maroof et al., 1994) استخراج گردید و برای تعیین غلظت و کیفیت DNA استخراج شده از الکتروفورز ژل آگارز استفاده شد و نمونه‌هایی که کیفیت DNA آنها مناسب نبود، مجدداً استخراج شدند. برای انجام واکنش PCR تیوپ‌ها در دستگاه PCR (iCycler) در معرض دوره‌های حرارتی بهینه شده قرار گرفتند و دستگاه برای ۳۶ دور واکنش به صورت دمای کاهشی (با کاهش یک درجه دمای اتصال آغازگرها در هر دور تا رسیدن به دمای واقعی اتصال) (Don et al., 1991) برنامه‌ریزی شد.

جدول ۱- نام و منشا ژنوتیپ‌های برنج مطالعه شده در این تحقیق

Table 1. Name and origin of the studied rice genotypes in current study

ژنوتیپ	منشا	ژنوتیپ	منشا
Genotype	Origin	Genotype	Origin
-	IRRI	چمپا	ایران
IR55411-50	IRRI	Champa	IRAN
-	IRRI	-	IRRI
IR82590-B-B90-4	IRRI	IR2441	IRRI
-	IRRI	سرداری	ایران
IR82590-B-B98-2	IRRI	Salari	IRAN
-	IRRI	لاین ۳۰	ایران
IR65261-09-1-B	IRRI	Line225	IRAN
-	IRRI	دمسیاه	ایران
CTB516-24-3-2	IRRI	Domsiah	IRAN
-	IRRI	-	IRRI
IR83754-B-B40-4	IRRI	IR20	IRRI
کورال	INDIA	سنگ طارم	ایران
Koral	INDIA	Sang Tarum	IRAN
-	IRRI	لاین ۲۲۹	ایران
WAB181-18	IRRI	Line229	IRAN
گرادلو	ITALY	حسینی	ایران
Gradlo	ITALY	Hashemi	IRAN
-	IRRI	غریب سیاه ریحانی	ایران
IRAT170	IRRI	Gharib Siah Rihani	IRAN
-	IRRI	-	IRRI
WAB96-1-1	IRRI	IR60080-4	IRRI

نانوگرم در میکرولیتر به میزان ۰/۴ میکرولیتر، DNA الگو با غلظت ۱۰ نانوگرم در میکرولیتر به میزان ۲ میکرولیتر و آب مقطر ۳/۲ میکرولیتر بود. ۲۲ جفت آغازگر مورد استفاده در این تحقیق توسط شرکت MWG

هر واکنش شامل ۵ میکرولیتر محلول مادری (PCR Buffer 10X, dNTPs 2mM, MgCl₂ 50mM, Tag Polymerase 5U/μL) که از شرکت سیناکلون خریداری شد، آغازگر مستقیم و معکوس هر یک با غلظت ۶۰

باند‌ها از نیترا نقره استفاده شد (Benbouza *et al.*, 2006). الگوی نواری باند‌ها بر اساس محل قرارگیری و اندازه باند‌ها، امتیازدهی شد. برای تجزیه و تحلیل پارامترهای مربوط به جمعیت مانند محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC)، فاصله ژنتیکی بین ژنوتیپ‌ها و رسم دندروگرام تجزیه خوشه‌ای از نرم‌افزار Power Marker (Liu and Muse, 2005) ver. 3.25 و برای تجزیه به مولفه‌های اصلی از نرم‌افزار NTSYSpc 2.02 (Rohlf, 2000) استفاده شد.

Biotech کشور آلمان ساخته شد. فهرست کامل این آغازگرها در جدول ۲ ارائه شده است. این آغازگرها با استفاده از نقشه‌های SSR ارائه شده توسط چن و همکاران (Chen *et al.*, 1997)، تمنیخ و همکاران (Temnykh *et al.*, 2000) و مک‌کوش و همکاران (McCouch *et al.*, 2002) بر اساس پیوستگی با صفات مقاومت به خشکی در برنج انتخاب شدند. پس از اتمام واکنش PCR نمونه‌ها از دستگاه خارج و تا هنگام الکتروفورز در فریزر -۲۰ درجه سلسیوس نگهداری شدند. برای آشکارسازی قطعات حاصل از واکنش PCR از ژل پلی‌اکریلامید ۶٪ استفاده شد. برای رنگ‌آمیزی ژل و ظهور

جدول ۲- نشانگرهای SSR مورد مطالعه در این تحقیق

Table 2. Characteristics of the studied SSR markers in this research

نشانگر Marker	کروموزوم Chromosome	آغازگر همسو Forward primer	آغازگر برگشتی Reverse primer	QTL های پیوسته* Related QTLs*
RM3475	1	GTCGGTTTGCCTAGTTGAGC	TTCCTCGGTGTATGGGTCTC	RL, RSR (Ikeda <i>et al.</i> , 2007)
RM8231	1	GCGTAAGATCTCCCTACCAC	CAACACATGATAGCACATGG	LR (Vasant, 2012)
RM3688	2	GTTGAATCAAGCTGTGCAGC	AGCTAGGCAAAGCATGCATG	LD (Vasant, 2012)
RM7426	2	TGACATGGATCGATCAGCTC	ATAAGGGTACGGGGAACCAG	LR (Vasant, 2012)
RM416	3	GGTAAATGGACAATCCTATGGC	GACAAATATAAGGGCAGTGTGC	RW (Qu <i>et al.</i> , 2008)
RM7000	3	CCCTTCTTTTCAACTGAATA	TTGTAACAATGAACTCGTTC	RSR (Vasant, 2012)
RM6589	4	AAGTTCACAACACGTCGTCG	CGACGCTGTTGATCAGCC	RN (Zhu and Xiong, 2013)
RM119	4	CATTGGAGTGGAGGCTGG	GTCAGGCTTCTGCCATTCTC	RT (Périn <i>et al.</i> , 2013)
RM480	5	GCTCAAGCATTTCTGCAGTTG	GCACTTCTGCTTATTGGAAG	RW, RL (Qu <i>et al.</i> , 2008)
RM5371	6	GGCTAGCTTTAGCTGCGTTG	ACCCAGATCGAAACAACTGC	RT (Vasant, 2012)
RM11	7	TCTCTCTTCCCCGATC	CTAAGCCTCGCCCGCTAT	SW (Ranawake and Nakamura, 2012)
RM134	7	ATCCTACCGCTGACCATGAG	TTTGGTCTACGTGGCGTACA	RL (Périn <i>et al.</i> , 2013)
RM152	8	TACACCTCATCGATCAATCG	CTTTGGAATCTGAAGATC	RW (Périn <i>et al.</i> , 2013)
RM5720	7	CCTGATAAATTGACAGTTAC	GAGAGTAGGAGTTGATAACA	RW, RN (Zhu and Xiong, 2013)
RM7424	9	AGAAGCCCATCTAGCAGCAG	TCAAGCTAGCCACACAGCTG	RSR (Périn <i>et al.</i> , 2013)
RM5702	9	TGGGATAAATAGAAAAGTCT	ATTGGACACGTACATAATAA	LR (Périn <i>et al.</i> , 2013)
RM184	10	ATCCCATTCGCCAAAACCGGCC	TGACACTTGAGAGCGGTGTGG	RSW (Ranawake and Nakamura, 2012)
RM4455	10	CTCTCAAAGAACTAGGACTC	GAGAAGGTATGATAACCAAT	RL (Périn <i>et al.</i> , 2013)
RM144	10	GTGGACTTCATTTCAACTCG	GATGTATAAGATAGTCCC	RN (Qu <i>et al.</i> , 2008)
RM5774	5	CTTTCATAATTCTAGCTTA	CTTTCATAATTCTAGCTTA	RT (Périn <i>et al.</i> , 2013)
RM276	6	CTCAACGTTGACACCTCGTG	TCCTCCATCGAGCAGTATCA	RN, RT (Qu <i>et al.</i> , 2008)
RM1337	12	GCTGAGGAGTATCCTTTCTC	ACCATAGGAAGATCATCACA	RL (Zhu and Xiong, 2013)

* QTL های پیوسته عبارت‌اند از: RL طول ریشه، RSR نسبت طول ریشه به ساقه، RW وزن ریشه، SW وزن ساقه، RSW نسبت وزن ریشه به ساقه،

RN تعداد ریشه، RT ضخامت ریشه، LR پیچیدگی برگ، LD خشکیدگی برگ.

* The related QTLs are: RL, root length; RSR, root to shoot ratio; RW, root weight; SW, shoot weight; RSW, root to shoot weight ratio; RN, root number; RT, Root thickness; LR, leaf rolling; LD, leaf drying.

نتایج و بحث

با استفاده از ۲۲ جفت آغازگر اختصاصی که پیوستگی آنها با QTL‌های کنترل کننده صفات مرتبط با خشکی قبلاً گزارش شده بود (جدول ۲)، در مجموع ۱۰۶ آلل مشاهده شد. تعداد آلل‌های مشاهده شده در جایگاه‌های مختلف از ۲ تا ۷ آلل متغیر و میانگین آنها در کل ژنوتیپ‌ها ۴/۸۲ آلل بود. بیشترین تعداد آلل‌ها در جایگاه‌های RM7426، RM8231، RM7000 و کمترین تعداد آلل‌ها در جایگاه‌های RM7424 و RM119 مشاهده شد (جدول ۴). تمامی ۲۲ جایگاه ریزماهواره در بین ژنوتیپ‌های مورد مطالعه دارای چندشکلی بودند. نمونه‌ای از نوارهای الکتروفورزی مشاهده شده در این تحقیق در شکل ۱ ارائه شده است.

تجزیه واریانس داده‌ها (جدول ۳)، اختلاف بین ژنوتیپ‌ها را برای صفات مورد بررسی معنی‌دار نشان داد که حاکی از وجود تنوع ژنتیکی برای صفات ارزیابی شده در مرحله گیاهچه‌ای در ژنوتیپ‌های مورد بررسی بود. اعمال تنش خشکی ۸- بار، موجب تفاوت معنی‌دار میانگین صفات طول ساقه، طول ریشه، وزن خشک ساقه و وزن خشک ریشه با شرایط بدون تنش شد. علاوه بر آن، برهمکنش ژنوتیپ×شرایط کشت نیز برای صفات مورد بررسی معنی‌دار بود، به این معنی که ژنوتیپ‌های مورد مطالعه واکنش یکسانی در دو شرایط کشت (محلول غذایی نرمال و محلول غذایی حاوی مانیتول ۸- بار) نداشتند و روند تغییرات آنها در دو شرایط از نظر هر خصوصیت متفاوت بود (جدول ۳).

جدول ۳- تجزیه واریانس صفات مورد مطالعه در ژنوتیپ‌های برنج تحت شرایط نرمال و تنش خشکی

Table 3. Analysis of variance of the studied traits in rice genotypes under normal and drought stress conditions

Source of variation	منابع تغییرات	درجه آزادی df	میانگین مربعات Mean square			
			وزن خشک ساقه Shoot weight	وزن خشک ریشه Root weight	طول ساقه Shoot length	طول ریشه Root length
Genotype (G)	ژنوتیپ	21	$4.63 \times 10^{-6**}$	$2.17 \times 10^{-6**}$	29.76^{**}	22.5^{**}
Culture conditions (C)	شرایط کشت	1	$4.43 \times 10^{-5**}$	$3.41 \times 10^{-6**}$	270.72^{**}	69.16^{**}
G×C	ژنوتیپ×شرایط کشت	21	$6.5 \times 10^{-6**}$	$4.4 \times 10^{-6**}$	0.6^*	0.45^{**}
Error	خطای آزمایش	88	2×10^{-8}	5×10^{-8}	0.6	0.02
CV (%)	ضریب تغییرات (%)	-	1.179	6.449	7.77	2.68

* and **: Significant at 5% and 1% probability levels, respectively.

* و **: به ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪ و ۱٪.

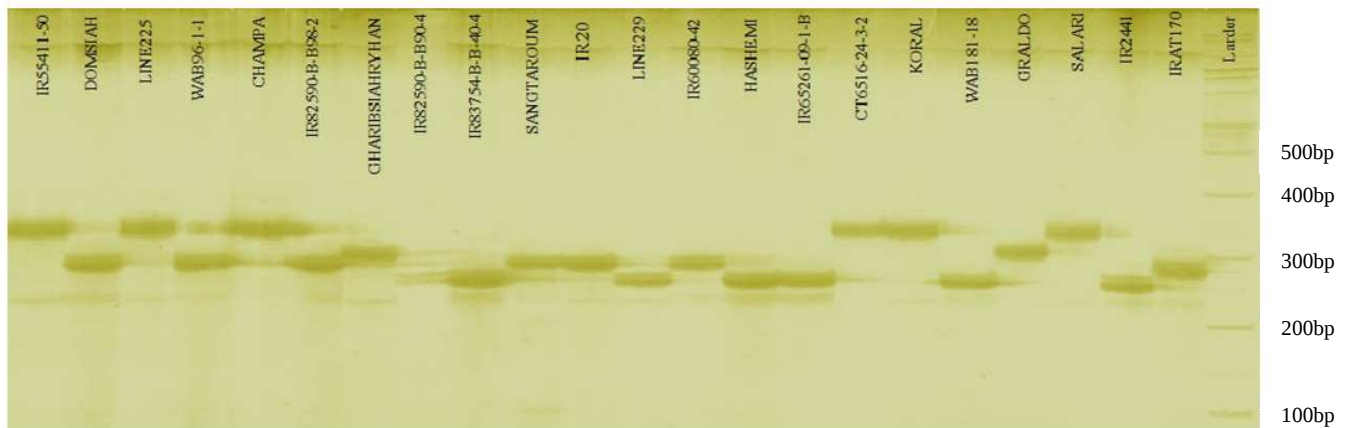
ژنوتیپ‌های برنج و وجود تنوع ژنتیکی بین ژنوتیپ‌های مورد مطالعه می‌باشد. نشانگر RM7426 نیز با بیشترین تعداد آلل، PIC و تنوع ژنی، به عنوان مناسب‌ترین نشانگر برای نمایش تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های مطالعه شده بود. در ارزیابی گریشما شاه و همکاران (Grishma Shah et al., 2012) نیز در میان ۳۰ نشانگر ریزماهواره استفاده شده، ۲۵ نشانگر چندشکل بودند که ۲۳۱ آلل تولید کردند. تعداد آلل‌ها از ۵ تا ۱۷ آلل متغیر بوده و میانگین آن ۹/۴ آلل در هر نشانگر بود. مقدار PIC برای ۲۵ نشانگر ریزماهواره از ۰/۷۴ تا ۰/۹۲ متغیر بود. ربانی و همکاران (Rabbani et al., 2010) تعداد ۴۱ رقم برنج ایندیکا از گروه‌های باسماتی و غیر باسماتی را با استفاده از ۳۰ نشانگر ریزماهواره که در کل ژنوم توزیع شده بودند، ارزیابی و در کل ۱۰۴ آلل شناسایی کردند که صد در صد

محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC)، برای جایگاه‌های ریزماهواره از ۰/۲۹ تا ۰/۸۲ و میانگین آن ۰/۶۴ بود. کمترین مقدار PIC برای آغازگرهای RM7424 و RM119 و بیشترین مقدار برای آغازگرهای RM7426، RM184 و RM7000 مشاهده شد. مقدار تنوع ژنی متفاوت، بیانگر تصادفی بودن آلل‌ها در جمعیت است. این تنوع برای جایگاه‌های ریزماهواره بین ۰/۳۵۱ تا ۰/۸۴۰ و به طور میانگین برابر ۰/۶۸۶ بود. کمترین مقدار تنوع ژنی برای جایگاه‌های RM7424 و RM119 مشاهده و بیشترین مقدار آن برای جایگاه‌های RM7426، RM184 و RM276 مشاهده شد (جدول ۴).

نتایج و میانگین‌های بالای تعداد آلل موثر، ارزش PIC و تنوع ژنی مشاهده شده در جایگاه‌های ریزماهواره، بیانگر کارآمدی ریزماهواره‌های مورد استفاده برای تمایز ژنتیکی

با مقایسه نتایج دیگران با نتایج حاصل از این تحقیق با توجه به تعداد ژنوتیپ‌ها و تعداد نشانگرهای مورد استفاده حصول این تعداد آلل و کسب میانگین تقریباً مشابه با سایر پژوهش‌ها، نشان دهنده توانایی و کارایی مناسب نشانگرهای ریزماهواره در تمایز ژنوتیپ‌های برنج است.

چندشکل بودند. تعداد آلل تولید شده توسط هر نشانگر بین ۲ تا ۶ با میانگین ۳/۵ آلل بود. محتوی اطلاعات چندشکلی (PIC) بین ۰/۲۵۹ تا ۰/۷۸۲ متغیر و میانگین آن ۰/۵۷۱ بود. ضریب تشابه (ضریب نی) بین ۰/۹۹ تا ۰/۱ مشاهده شد. تجزیه خوشه‌ای بر اساس چندشکلی ریزماهواره‌ها ۴۱ رقم را به دو شاخه بزرگ گروه‌بندی کرد.



شکل ۱- فرآورده PCR نشانگر RM5774 روی ژل اکریلامید ۶ درصد در ۲۲ ژنوتیپ برنج مورد مطالعه

Figure 1. PCR products of RM5774 marker on 6% acrylamide gel in 22 studied rice genotypes

جدول ۴- تعداد آلل، اندازه آلل‌ها، محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC) و تنوع ژنی هر یک از نشانگرها در ژنوتیپ‌های برنج مورد مطالعه

Table 4. Number of alleles, allele size, PIC and gene diversity of each marker in the studied rice genotypes

نشانگر	کروموزوم	تعداد آلل‌ها	اندازه آلل‌ها (جفت باز)	محتوای اطلاعات چندشکلی	تنوع ژنی
Marker	Chromosome	No. of alleles	Allele size (bp)	PIC	Gene diversity
RM3475	1	5	110-190	0.586	0.625
RM8231	1	7	160-250	0.666	0.695
RM3688	2	5	100-150	0.745	0.781
RM7426	2	7	100-180	0.819	0.840
RM416	3	5	50-150	0.732	0.771
RM7000	3	7	100-150	0.762	0.790
RM6589	4	6	50-180	0.707	0.746
RM119	4	2	100-200	0.360	0.471
RM480	5	5	200-300	0.608	0.650
RM5371	6	5	120-180	0.749	0.784
RM11	7	5	110-200	0.701	0.740
RM134	7	5	50-150	0.724	0.761
RM152	8	3	100-230	0.559	0.635
RM5720	7	5	150-250	0.680	0.722
RM7424	9	2	50-150	0.289	0.351
RM5702	9	5	100-250	0.631	0.686
RM184	10	6	200-350	0.791	0.816
RM4455	10	3	100-200	0.535	0.611
RM144	10	4	200-350	0.505	0.556
RM5774	5	4	250-350	0.603	0.655
RM276	6	6	100-200	0.781	0.808
RM1337	12	4	200-300	0.559	0.609

یکدیگر دورترند، می‌تواند دورگ‌هایی تولید کند که احتمالاً پتانسیل ژنتیکی بالاتری از والدین خود دارند. تجزیه خوشه‌ای بر اساس داده‌های مولکولی به روش UPGMA و ضریب تشابه جاکارد با استفاده از نرم‌افزار Power Marker انجام شد. برش دندروگرام با هدف گروه‌بندی ژنوتیپ‌های مورد مطالعه، بر اساس بیشترین فاصله محل ادغام ژنوتیپ‌ها و با توجه به خصوصیات و ویژگی‌های مهم آنها انجام شد. بر این اساس، ژنوتیپ‌های مورد مطالعه در دو گروه قرار گرفتند. ژنوتیپ‌های IR82590-B-B90-4، WAB96-1-1، WAB181-18 و Gradlo، IR55411-50، IR83754-B-B-40-4 و Koral در یک گروه و ژنوتیپ‌های IR82590-B-B98-2، CTB516-24-3-2، IR60080-42، IR65261-09-1-B، Line229، Line225، IR20، IR2441، IRAT170، دم‌سیاه، چمپا، هاشمی، سالاری، سنگ طارم و غریب سیاه‌ریحانی در گروه دوم قرار گرفتند.

در ماتریس حاصل از تجزیه داده‌های مولکولی، فاصله ژنتیکی بین ژنوتیپ‌های مورد مطالعه در محدوده ۰/۲۳۰ تا ۰/۹۹۹ متغیر بود (جدول ۵)، که نشان دهنده تنوع بالای موجود در سطح ژنوم این ژنوتیپ‌ها بود. در بین ژنوتیپ‌های مورد مطالعه، کمترین فاصله بین ژنوتیپ‌های IR20 و IR2441 و بیشترین فاصله بین ژنوتیپ‌های IR82590-B-B98-2، IR82590-B-B98-2، Line229 و Line229 و Koral مشاهده شد. کبریا و همکاران (Kibria *et al.*, 2009) نیز بیشترین فاصله ژنتیکی نی را در بین ژنوتیپ‌های مورد مطالعه خود بر اساس نشانگرهای SSR مقدار ۰/۳۰۶ و بر اساس نشانگرهای RAPD مقدار ۰/۷۶۳ گزارش کرده و با استفاده از روش UPGMA ژنوتیپ‌ها را به دو گروه تقسیم کردند. نتایج حاصل از تنوع و فاصله ژنتیکی برای انتخاب والدین به منظور بهبود ارزش اصلاحی ژنوتیپ‌ها مفید است، به طوری که تلاقی بین ژنوتیپ‌هایی که از

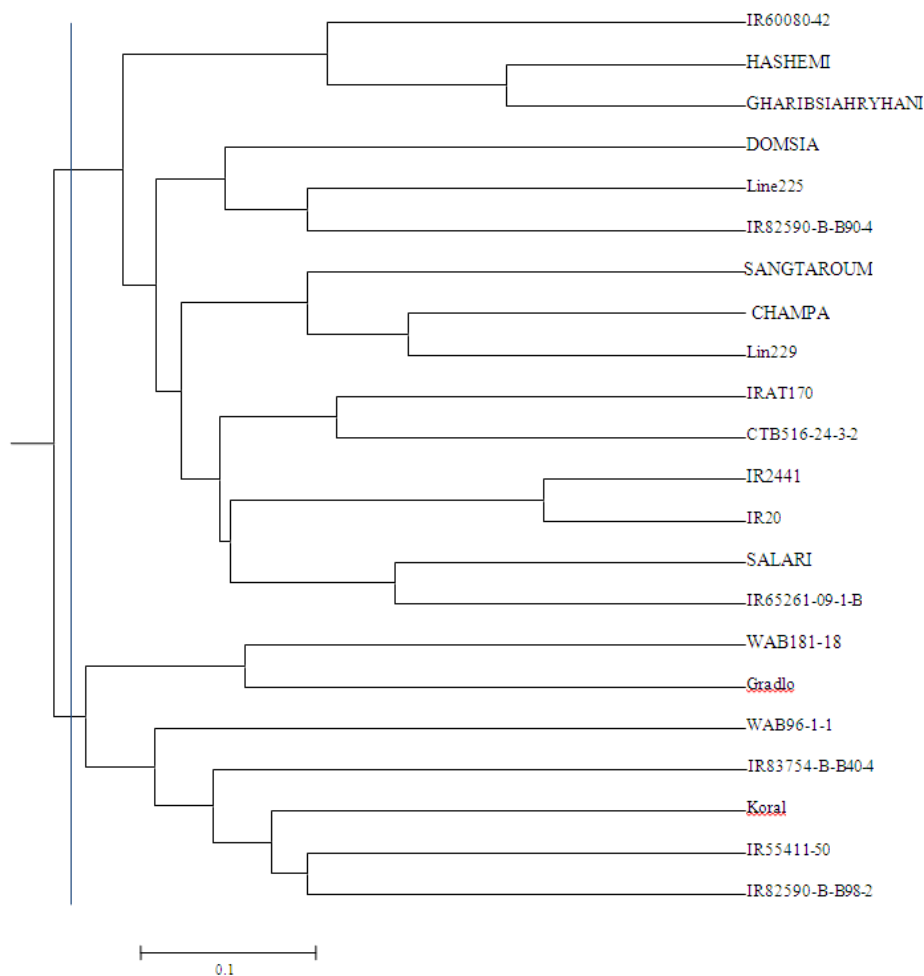
جدول ۵- فاصله ژنتیکی نی بین ژنوتیپ‌های مورد بررسی

Table 5. Nei's genetic distance among the studied genotypes

ژنوتیپ Genotype	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
1. IR55411-50	0																					
2. IRAT170	0.72	0																				
3. WAB96-1-1	0.58	0.81	0																			
4. Champa	0.66	0.64	0.87	0																		
5. IR2441	0.75	0.61	0.78	0.57	0																	
6. Salari	0.9	0.58	0.76	0.66	0.5	0																
7. Line225	0.7	0.69	0.93	0.57	0.42	0.63	0															
8. Domsiah	0.75	0.73	0.86	0.71	0.71	0.57	0.57	0														
9. IR20	0.81	0.61	0.86	0.57	0.23	0.63	0.61	0.69	0													
10. Sangtaroum	0.63	0.8	0.91	0.5	0.66	0.75	0.7	0.69	0.63	0												
11. Line229	0.6	0.72	0.76	0.38	0.6	0.72	0.63	0.61	0.69	0.5	0											
12. IR82590-B-B90-4	0.66	0.71	0.66	0.53	0.66	0.54	0.5	0.61	0.72	0.77	0.66	0										
13. Hashemi	0.72	0.75	0.71	0.86	0.78	0.53	0.84	0.57	0.66	0.76	0.75	0.63	0									
14. Gharibsiyahryhani	0.9	0.75	0.69	0.75	0.81	0.66	0.72	0.69	0.54	0.72	0.7	0.66	0.27	0								
15. IR60080-42	0.54	0.62	0.73	0.75	0.75	0.9	0.72	0.69	0.54	0.63	0.7	0.76	0.45	0.5	0							
16. IR82590-B-B98-2	0.5	0.83	0.69	0.91	0.81	0.8	0.9	0.99	0.9	0.75	0.99	0.64	0.8	0.8	0.99	0						
17. IR65261-09-1-B	0.84	0.54	0.83	0.66	0.66	0.4	0.7	0.72	0.54	0.5	0.66	0.83	0.63	0.54	0.9	0.7	0					
18. CT6516-24-3-2	0.78	0.46	0.75	0.53	0.64	0.69	0.71	0.73	0.53	0.72	0.54	0.81	0.86	0.71	0.61	0.92	0.57	0				
19. IR83754-B-B-40-4	0.61	0.76	0.73	0.69	0.78	0.64	0.69	0.8	0.83	0.84	0.81	0.69	0.69	0.83	0.92	0.63	0.58	0.73	0			
20. Koral	0.58	0.73	0.68	0.92	0.71	0.75	0.85	0.86	0.93	0.91	0.99	0.71	0.76	0.93	0.93	0.5	0.75	0.8	0.57	0		
21. WAB181-18	0.93	0.62	0.68	0.87	0.73	0.71	0.76	0.92	0.78	0.92	0.93	0.76	0.8	0.83	0.85	0.83	0.76	0.8	0.86	0.64	0	
22. Galdo	0.72	0.69	0.75	0.78	0.57	0.63	0.69	0.71	0.75	0.81	0.8	0.69	0.86	0.83	0.83	0.72	0.72	0.64	0.69	0.64	0.57	0

در ارقام محلی و جوامع گیاهی پراکنده بوده و در طول هزاران سال توسط زارعین و طبیعت به خاطر سازگاری، مقاومت و محصول دهی گزینش شده‌اند. در مطالعه آلواریز و همکاران (Alvarez et al., 2007) نیز بیشترین هتروزیگوسیتی در واریته‌های بومی نسبت به واریته‌های اصلاح شده مشاهده شد. تجزیه خوشه‌ای نیز تنوع ژنتیکی بین ارقام مورد مطالعه را بر اساس منشا آنها نشان داد و توانست ارقام را مطابق با منشا آنها در سه گروه مختلف تقسیم کند.

همان‌طور که در شکل ۲ مشاهده می‌شود، تمامی ژنوتیپ‌های ایرانی به همراه تعدادی از ارقام IRRI در یک گروه قرار گرفتند که نشان دهنده قرابت ژنتیکی بین ارقام ایرانی می‌باشد و ارقام ایتالیایی و هندی با تعداد دیگری از ارقام IRRI در گروه دیگر قرار دارند. گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها در دو گروه بیانگر تنوع بین ژنوتیپ‌های مورد مطالعه در مکان‌های ژنی مورد نظر می‌باشد. تنوع ژنتیکی بین ژنوتیپ‌ها همبستگی معینی با پراکندگی جغرافیای آنها دارد. ژنوتیپ‌های که در شرایط متفاوت کشت شده‌اند طی سال‌ها حاوی ژن‌های متفاوتی شدند. این ژن‌های متفاوت



شکل ۲- تجزیه خوشه‌ای ژنوتیپ‌های برنج مورد مطالعه به روش UPGMA با استفاده از ضریب تشابه جاکارد

Figure 2. Cluster analysis of the studied rice genotypes by UPGMA method using Jaccard's similarity coefficient

درصد از تغییرات را توجیه کردند. از آنجایی که این نشانگرها پیوسته به QTLهای کنترل‌کننده مقاومت به خشکی در برنج بودند، توجیه درصد بالایی از تغییرات توسط مولفه اول دور از انتظار نبود. بنابراین، این نشانگرها

گروه‌بندی ژنوتیپ‌های برنج با استفاده از تجزیه به مولفه‌های اصلی نیز انجام شد. در این تحقیق ۱۰ مولفه توانستند ۹۸/۵۱ درصد از تغییرات کل را توجیه کنند (جدول ۶). مولفه‌های اول و دوم به ترتیب ۶۸/۴۴ و ۴/۶۳

هر یک از شرایط مورد مطالعه (شرایط نرمال و تحت تنش) انجام شد. نتایج این تجزیه در جدول ۷ ارائه شده است.

بر اساس تجزیه رگرسیون داده‌های مولکولی و صفات مورفولوژیک، در مجموع ۱۶ نشانگر آگاهی‌بخش (مثبت) برای صفات مورفولوژیک شناسایی شد. از بین صفات مورد مطالعه، فقط برای صفت وزن ریشه تحت شرایط تنش، نشانگر آگاهی‌بخشی وجود نداشت. ضرایب تبیین تصحیح شده نشان دادند که بیش از ۵۰ درصد از تنوع صفات مورفولوژیک توسط نشانگرهای آگاهی‌بخش شناسایی شده توجیه می‌شوند. آلل RM276-A به طور مشترک برای صفت طول ریشه در هر دو شرایط و آلل RM276-B برای صفت طول ساقه در شرایط نرمال و آلل RM8231-C به طور مشترک برای صفت وزن ریشه در هر دو شرایط و آلل RM8231-A به طور مشترک برای صفت وزن ساقه در هر دو شرایط بودند. وزن ریشه در شرایط تنش دارای بیشترین میزان تغییرات تبیین شده و وزن خشک ساقه در شرایط تنش دارای کمترین میزان تبیین شده توسط آلل‌ها بودند.

به طور کلی، ارتباط معنی‌دار برخی از صفات مورفولوژیک با نشانگرهای ریزماهواره نشان داد که می‌توان در برنامه‌های اصلاحی از گزینش غیرمستقیم به منظور بهبود و اصلاح صفات مورفولوژیک برنج بهره جست. همچنین، نشانگرهای کاندیدا امکان دستورزی ژنتیکی برای انتخاب صفات مطلوب مورفولوژیک و زراعی را به اصلاح‌گران می‌دهند.

در بررسی ویرک و همکاران (Virk *et al.*, 2000) نیز رگرسیون چندگانه با استفاده از ۶۳ نشانگر RAPD و ۳۹ آلوزایم نشان داد که ۲۹ نشانگر حدود ۹۹ درصد تغییرات کل را توجیه کردند. به عقیده این محققان اگر پیوستگی ژنتیکی علت اصلی رابطه بین نشانگرهای مولکولی و صفات کمی باشد، انتخاب به کمک نشانگر برای گزینش والدین برتر به منظور تولید جمعیت‌های واجد QTL‌های مطلوب می‌تواند بسیار ارزشمند و کارا باشد. در بررسی وانیاراجان و همکاران (Vanniarajan *et al.*, 2012) نیز از شاخص تفکیک آلل برای تعیین قدرت تمایز هر صفت در جمعیت استفاده شد. داده‌های فنوتیپی از صفات کیفی و کمی جمع‌آوری شد. در هر دو تجزیه خوشه‌ای، سلسله مراتبی با استفاده از نزدیکترین همسایه و روش آنالیز ساختار جمعیت، ژنوتیپ‌ها به گروه‌های جداگانه تقسیم شدند. آنها نتیجه گرفتند که بسیاری از آلل‌های مخصوص جمعیت، می‌توانند برای شناسایی ارقام ژاپونیکا استفاده شوند.

به طور غیر مستقیم گویای اطلاعات ژنوتیپ‌ها از نظر تحمل به تنش خشکی بودند. از طرف دیگر، وارد شدن تعداد مولفه‌های زیاد در تجزیه به مولفه‌های اصلی نشان داد که جایگاه‌های زیادی در بررسی تنوع دخالت داشتند. بنابراین، جایگاه‌های ریزماهواره مورد استفاده دارای چند شکلی بالایی بوده و انتخاب آنها صحیح بوده است. از طرفی تعدادی از نشانگرهای مورد بررسی توانستند تنوع موجود در بین ژنوتیپ‌های برنج را به میزان زیادی نشان دهند. در نمودار پراکنش دو بعدی، تجمع ژنوتیپ‌ها در یک ناحیه مشابه، نشان دهنده تشابه ژنتیکی آنها است.

نمودار دو بعدی بر اساس مولفه‌های اول و دوم، ژنوتیپ‌ها را در چهار گروه قرار داد (شکل ۳). گروه اول شامل ژنوتیپ‌های WAB181-18 و WAB96-1-1، گروه دوم شامل ژنوتیپ‌های سالاری، IR82590-B-B90-4، IR82590-B-B98-2 و Gradlo، IR83754-B-B-40-4، گروه سوم شامل ژنوتیپ‌های IR60080-42، Koral، IR20، Line229، IR2441، Line225، IR20، CTB516-24-3-2، دم‌سیاه، چمپا، هاشمی، سنگ‌طارم و غریب‌سیاه‌ریحانی و گروه چهارم شامل ژنوتیپ‌های IR65261-09-1-B و IR55411-50 بودند. تجزیه به مولفه‌های اصلی به دلیل توجیه درصد واریانس بالای دو مولفه اول، توانست تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌ها را به طور بسیار مطلوبی نمایش دهد، به طوری که گروه‌بندی بر اساس مولفه‌های اصلی با گروه‌بندی بر اساس تجزیه خوشه‌ای مطابقت زیادی داشت. فاصله ژنوتیپ‌ها در این نمودار با فاصله آنها در ماتریس فاصله ژنتیکی شباهت داشت. در بررسی تنوع ژنتیکی با استفاده از داده‌های مولکولی بهترین حالت این است که نشانگرهای مولکولی از کروموزوم‌های مختلف انتخاب شده و توزیع یکنواخت در ژنوم داشته باشند. با توجه به این که در این تحقیق از دو جفت نشانگر روی هر کروموزوم برنج استفاده شد، بنابراین تنوع ژنتیکی به خوبی نشان داده شده است. نتیجه تجزیه به مولفه‌ها نیز این مطلب را تأیید کرد. با توجه به نتایج، این نشانگرها برای استفاده در تحقیقات بعدی توصیه می‌شوند.

رابطه بین داده‌های مولکولی و صفات مورد مطالعه در ژنوتیپ‌های برنج با استفاده از رگرسیون چندگانه بررسی شد، به این ترتیب که هر صفت مورفولوژیک به عنوان متغیر وابسته و نشانگرهای ریزماهواره به عنوان متغیرهای مستقل در نظر گرفته شدند و تجزیه به طور جداگانه برای

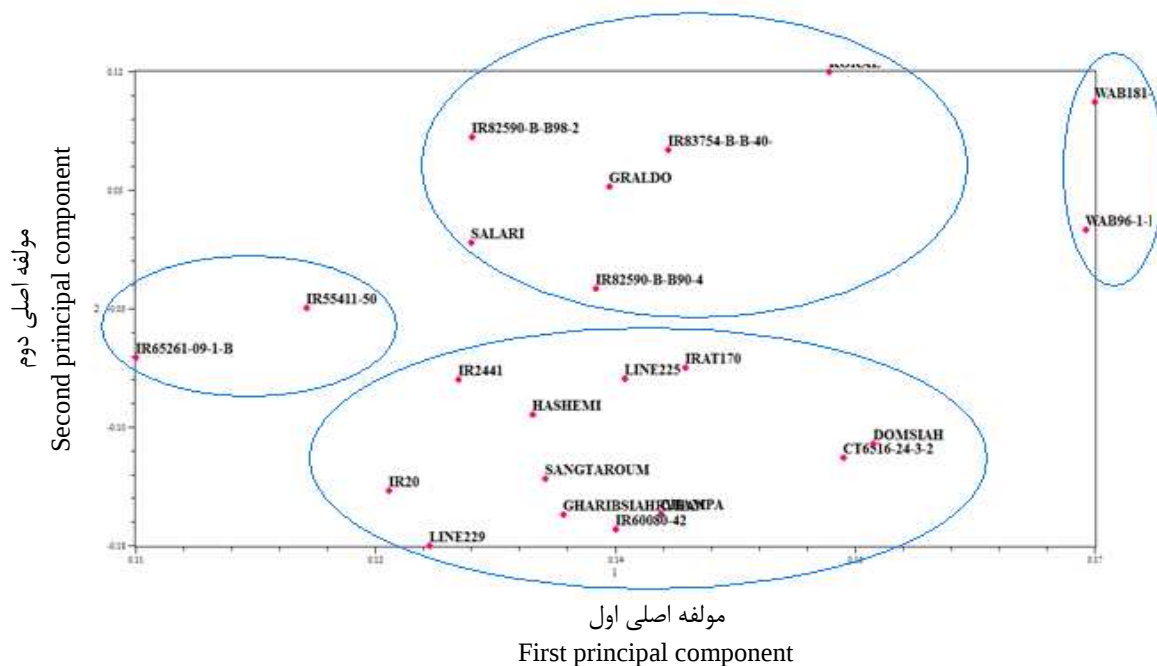
با استفاده از نشانگرهای مولکولی ارزیابی شوند، داده‌های حاصل از نشانگر ابزار ارزشمندی برای پیش‌بینی ارزش سایر ژرم‌پلاس‌های آن گونه گیاهی و نیز شناسایی ماده ژنتیکی مطلوب حتی در شرایط آزمایشگاهی خواهد بود. بنابراین، این مطالعه ارزش ژرم‌پلاس گیاهی را به عنوان ذخایر ژن‌های مفید یا به عنوان منابع اطلاعات صفات فنوتیپی مشخص می‌کند (Shokrpour *et al.*, 2008).

کاربرد نشانگرهای مولکولی (که کم و بیش دارای توزیع تصادفی در ژنوم هستند) به همراه تجزیه رگرسیون، کمک قابل توجهی در استفاده از تنوع ژنتیکی گیاهان فراهم می‌کند. ترکیب روش‌های مختلف، پیش‌بینی وضعیت رشد گیاه مشخصی در یک محیط معین را پیش از اجرای آزمایش مزرعه‌ای میسر خواهد کرد. علاوه بر آن، در صورتی که تعدادی از ژرم‌پلاس‌های یک گونه گیاهی از لحاظ صفات کمی مهم برای شرایط خاص (مانند تحمل به تنش)

جدول ۶- مقدار ویژه، درصد واریانس هر مولفه و درصد واریانس تجمعی برای ده مولفه اصلی

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

مولفه اصلی Principal component	مقدار ویژه Eigen value	درصد واریانس Variance percentage	درصد واریانس تجمعی Cumulative variance
1	75.28	68.44	68.44
2	5.09	4.63	73.7
3	4.66	4.24	77.31
4	4.15	3.77	81.09
5	3.98	3.63	84.17
6	3.76	3.43	88.14
7	3.23	2.94	91.08
8	2.86	2.60	93.69
9	2.73	2.45	96.17
10	2.57	2.34	98.51



شکل ۳- پراکنش دو بعدی ژنوتیپ‌های برنج مورد مطالعه بر اساس دو مولفه اصلی اول و دوم

Figure 3. Bi-plot diagram of the studied rice genotypes based on first and second principal components

جدول ۷- تجزیه رگرسیون چندگانه بین صفات مورفولوژیک (متغیر وابسته) و نشانگرهای ریزماهواره (متغیر مستقل)
 Table 7. Multiple regression analysis among morphological traits (dependent variable) and microsatellite markers (independent variable)

نشانگرهای معنی‌دار Significant markers	ضریب رگرسیون Regression coefficient (slope)							
	وزن ساقه Shoot weight		وزن ریشه Root weight		طول ساقه Shoot length		طول ریشه Root length	
	تنش Stress	نرمال Normal	تنش Stress	نرمال Normal	تنش Stress	نرمال Normal	تنش Stress	نرمال Normal
عرض از مبدأ Intercept	0.013	0.014	0.003	0.004		13.568	4.521	6.041
RM8231-A	0.005	0.007						
RM8231-C		-0.006	0.002	0.003				
RM8231-E			-0.003	-0.003				
RM8231-G	-0.005							
RM7426-G	0.001							
RM119-A			-0.001	-0.001				
RM119-B			0.001	0.001				
RM11-B							-0.339	-0.453
RM184-C							-0.143	-0.191
RM4455-C						-0.212		
RM5774-B						-0.425		
RM276-A							0.241	0.321
RM276-B						-3.194		
RM276-C						2.991		
R^2 تصحیح شده Adjusted R^2	0.571	0.607	0.721	0.719		0.624	0.610	0.611

شباهت ژنتیکی نشان دهد، این دو از نظر مورفولوژیکی نیز شباهت قابل توجهی داشتند. ژنوتیپ‌هایی که از نظر صفات مورفولوژیک اختلاف زیادی داشتند، از نظر ژنتیکی نیز کمترین تشابه را نشان دادند. به هرحال، داده‌های ریزماهواره به میزان زیادی توانایی تکمیل اطلاعات حاصل از صفات مورفولوژیک را داشتند. به طور کلی، نتایج این پژوهش نشان داد که انتخاب بر اساس نشانگرهای مولکولی تأیید شده می‌تواند برای تسریع برنامه‌های اصلاح کلاسیک جهت انتخاب ژنوتیپ‌های برتر بسیار ارزشمند باشند.

در این تحقیق صفات مورفولوژیک گیاهچه برنج در دو محیط (نرمال و تنش) مورد بررسی قرار گرفتند. از طرفی با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره پیوسته با صفات تحمل به خشکی، تنوع ژنتیکی برنج مورد بررسی قرار گرفت. بر اساس تجزیه رگرسیون داده‌های مورفولوژیکی و نشانگر ریزماهواره ارتباط معنی‌داری بین دو سری داده مشاهده شد. از تنوع ژنتیکی بین ارقام مورد بررسی می‌توان در امور به‌نژادی به منظور تولید واریته‌های هیبرید و جمعیت‌های گیاهی با صفات مطلوب استفاده نمود. بررسی نتایج نشان داد در مواردی که اطلاعات مولکولی بین دو ژنوتیپ

References

- Aghazadeh, R., Ghareyazie, B., Nematzadeh, B. C. and Babaeian Jelodar, N. 2004. Classification of Iranian rice germplasm by RAPD markers. **Journal of Agricultural Science** 3: 757-767. (In Persian).
- Alvarez, A., Fuentes, J. L., Puldón, V., Gómez, P. J., Mora, L., Duque, M. C., Gallego, G. and Tohme, J. M. 2007. Genetic diversity analysis of Cuban traditional rice (*Oryza sativa* L.) varieties based on microsatellite markers. **Genetics and Molecular Biology** 4: 1109-1117.
- Amini Nasab, M., Ebrahimi, M. A., Ebadi, A. A. and Ghodsi, M. 2012. Study of genetic variation in Iranian rice varieties by using molecular markers linked to drought resistance genes. **Crop Biotechnology** 2 (2): 15-25.
- Benbouza, H., Jacquemin, J. M., Baudoin, J. P. and Mergeai, G. 2006. Optimization of a reliable, fast, cheap and sensitive silver staining method to detect SSR markers in polyacrylamide gels. **Biotechnology, Agronomy, Society and Environment** 2: 77-81.
- Chen, X., Temnykh, S., Xu, Y., Cho, Y. G. and McCouch S. R. 1997. Development of a microsatellite framework map providing genome-wide coverage in rice (*Oryza sativa* L.). **Theoretical and Applied Genetics** 95: 553-567.
- Don, R. H., Wainwright, P. T. and Mattick, J. S. 1991. Touchdown PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. **Nucleic Acids Research** 19: 408-418.
- Faridul Islam, A. S. M., Raihan Ali, M., Gregorio, G. B. and Rafiqul Islam, M. 2012. Genetic diversity analysis of stress tolerant rice (*Oryza sativa* L.). **African Journal of Biotechnology** 85: 15123-15129.
- Ganesh Ram, S., Venkatesan, T. and Vinod Kunnummal, K. 2007. Genetic diversity among cultivars, landraces and wild relatives of rice as revealed by microsatellite markers. **Journal of Applied Genetics** 48 (4): 337-345.
- Gregario, G. B. and Sedhira, D. 1993. Genetic analysis of salinity tolerance in rice. **Theoretical and Applied Genetics** 86: 333-338.
- Grishma, S. H., Sasidharan, N., Chakraborty, S., Trivedi, R., Ravikiran, R. and Davla, D. 2012. Genetic diversity and molecular analysis for fertility restorer genes in rice (*Oryza sativa* L.) for wild abortive (WA) cytoplasm using microsatellite markers. **Journal of Agricultural Technology** 8 (1): 261-271.
- Ikeda, H., Kamoshita, A. and Manabe T. 2007. Genetic analysis of rooting ability of transplanted rice (*Oryza sativa* L.) under different water conditions. **Journal of Experimental Botany** 58 (2): 309-318.
- Kibria, K., Nur, F., Begum, S. N., Islam, M. M., Paul, S. K., Rahman, K. S. and Azam, S. M. M. 2009. Molecular marker based genetic diversity analysis in aromatic rice genotypes using SSR and RAPD markers. **International Journal of Sustainable Crop Production** 4 (1): 23-34.
- Kumar, R., Kumar, A., Kumar, S. A. and Radha, J. 2012. Evaluation of genetic diversity in rice using simple sequence repeats (SSR) markers. **African Journal of Biotechnology** 84: 14956-14995.
- Liu, K. and Muse, S. V. 2005. Power Marker: An integrated analysis environment for genetic marker analysis. **Bioinformatics** 21: 2128-2129.
- McCouch, S. R., Teytelman, R. X. U. L., Katarzyna, Y. and Karen, B. 2002. Development and mapping of 2240 New SSR Markers for Rice (*Oryza sativa* L.). **DNA Research** 9: 199-207.
- Park, G. H., Kim, J. H. and Kim, K. M. 2014. QTL analysis of yield components in rice using a cheongcheong/nagdong doubled haploid genetic map. **American Journal of Plant Sciences** 5: 1174-1180.
- Périn, C., Divol, F., Henry, S., Puig, J., Diévert, A., Ahmadi, N., Courtois, B. and Guiderdoni, E. 2013. Root anatomy and architecture as determinants of abiotic stress tolerance in rice: Future is underground. Proceeding of 11th International Symposium on Rice Functional Genomics. November 20-23, New Delhi, India.
- Pervaiz, Z. H., Rabbani, M. A., Khaliq, I., Pearce, S. and Malik, S. A. 2010. Genetic diversity associated with agronomic traits using microsatellite markers in Pakistani rice landraces. **Electronic Journal of Biotechnology** 13 (3): 1-12.

- Rabbani, M. A., Masood, M. S. H., Shinwari, Z. Kh. and 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 (4): 2551-2564.
- Rabiei, B., Mardani, Z., Sabouri, H. and Sabouri, A. 2013.** Mapping of QTLs controlling tolerance to drought and salt stress at germination stage of rice. **Iranian Journal of Field Crop Science** 44 (4): 585-596.
- Ranawake, A. L. and Nakamura C. 2012.** QTL analysis of dehydration tolerance at seedling stage in rice (*Oryza sativa* L.). **Tropical Agricultural Research and Extension** 15 (4): 1-7.
- Rohlf, F. J. 2000.** NTSYS-pc: Numerical taxonomy and multivariate analysis system. Ver. 2.02. Exeter software. Setauket, New York.
- Sabouri, H., Gilaki, J., Jafarzadeh, M. R. and Sabouri, A. 2011.** Investigation of adaptation of rice varieties tolerant to drought stress in the Gonbad. Proceedings of the First National Congress on Science and Technology of Agriculture. September 10-12, Zanjan University, Zanjan, Iran. pp: 290-293.
- Safaei Chaeikar, S., Rabiei, B., Samizadeh, H. and Esfahani, M. 2008.** Evaluation of tolerance to terminal drought stress in rice (*Oryza sativa* L.) genotypes. **Iranian Journal of Crop Sciences** 9 (4): 315-331. (In Persian).
- Saghai Maroof, M. A., Biyashev, R. M., Yang, G. P., Zhang, Q. and Allard, R. W. 1994.** Extraordinarily polymorphic microsatellites DNA in barely species diversity chromosomal location and population dynamics. **Proceeding of the Academy of Sciences USA** 91: 5466-5470.
- Shokrpour, M., Mohammadi, A., Moghaddam, M., Ziaei, A. and Javanshir, A. 2008.** Analysis of morphologic association, phytochemical and AFLP markers in milk thistle (*Silybum marianum* L.). **Iranian Journal of Medical and Aromatic Plants** 24 (3): 278 -292. (In Persian).
- Sorosh, R., Mesbah, H., Hosseinzadeh, H. and Bozorgypour, A. 2005.** Study of phenotypic and genetic variation for quantitative and qualitative traits in rice. **Seed and Plant** 20: 167-182. (In Persian).
- Temnykh, S., Park, W. D., Ayres, N., Cartinhour, S., Hauck, N., Lipovich, L., Cho, Y. G., Ishii, T. and McCouch, S. R. 2000.** Mapping and genome organization of microsatellite sequences in rice (*Oryza sativa* L.). **Theoretical and Applied Genetics** 100: 697-712.
- Tuyen, D. D. and Prasad, D. T. 2008.** Evaluating difference of yield trait among rice genotypes (*Oryza sativa* L.) under low moisture condition using candidate gene markers. **Omonrice** 16: 24-33.
- Vasant, D. V. 2012.** Genome wide association mapping of drought resistance in rice (*Oryza sativa* L.). M. Sc. Dissertation. Dept. of Plant Biotechnology Centre for Plant Molecular Biology and Biotechnology, Tamil Nadu Agricultural University, India.
- Vanniarajan, C., Vinod, K. K. and Pereira, A. 2012.** Molecular valuation of genetic diversity and association studies in rice (*Oryza sativa* L.). **Journal of Genetics** 91: 9-19.
- Virk, P. S., Zhu, J. Newbury, H. J. Bryan, G. J. Jackson, M. T. and Ford-Lloyd, B. V. 2000.** Effectiveness of different classes of molecular marker for classifying and revealing variation in rice (*Oryza sativa*) germplasm. **Euphytica** 112: 275-284.
- Von Braun, J. and Virchow D. 1996.** Economic evaluation of biotechnology and plant diversity in developing countries. **Plant Research Development** 43: 50-61.
- Qu, Y., Mu, P., Zhang, H., Chen, C. Y., Gao, Y., Tian, Y., Wen, F. and Li, Z. 2008.** Mapping QTLs of root morphological traits at different growth stages in rice. **Genetica** 133:187-200.
- Yasmin, F., Islam, M. R., Rehana, S., Mazumder, R. R., Anisuzzaman, M., Khatun, H., Rayhan, R. and Gregorio, G. B. 2012.** Molecular characterization of inbred and hybrid rice genotypes of Bangladesh. **SABRAO Journal of Breeding and Genetics** 1: 163-175.
- Yoshida, S. 1981.** Fundamentals of rice crop science. International Rice Research Institute, Manila, Philippines. PP: 269.
- Zhu, X. and Xiong, L. 2013.** Control of drought resistance through cuticular wax deposition in rice. Proceeding of 11th International Symposium on Rice Functional Genomics. November 20-23, New Delhi, India.

Assessing genetic diversity of rice genotypes using microsatellite markers and their relationship with morphological characteristics of seedling stage under non- and drought-stress conditions

Mohammad Sarayloo¹, Hossein Sabouri^{2*} and Ahmad Reza Dadras³

1. M.Sc. Student, Islamic Azad University of Damghan, 2. Assoc. Prof., Dept. of Plant Production, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Gonbad Kavous University, 3. Ph. D. Student, Dept. of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Iran

(Received: December 3, 2013- Accepted: September 15, 2014)

Abstract

Marker assisted selection is one of the important applications molecular markers especially in creation of tolerant genotypes to environmental stresses in crop plants. In this research, seedlings of twenty two rice genotypes were investigated under two culture conditions (normal and drought stress via Manitol) on the basis of completely randomized factorial experiment with three replications at growth chamber of Faculty of Agriculture and Natural Resources, Gonbad Kavous University, Iran, in 2012, and root and shoot length and dry weight were measured. Analysis of variance showed that genotype×culture condition interactions were significant for all measured traits. This result revealed different reaction of the studied genotypes under two culture conditions and genetic diversity among the genotypes in seedling stage. To investigate the molecular diversity among the genotypes, genomic DNA was extracted amplified using 22 microsatellite markers linked to drought tolerance. In total, 106 alleles were detected with the number of 2-7 alleles and the average of 4.28 alleles per locus. The polymorphic information content (PIC) varied from 0.29 to 0.82 with the average of 0.64 and the gene diversity ranged from 0.351 to 0.840 with the average of 0.686. Genetic distance among the studied genotypes was also calculated in the range of 0.23 to 0.99. Cluster analysis using microsatellite data grouped the genotypes in two clusters. Result of principal component analysis showed that the first 10 principal components explained 98.51% of the total variation. Grouping of the genotypes according to first and second principal components assigned the studied genotypes into four groups. Results of these grouping methods demonstrate the suitability of the microsatellite markers to assess the genetic diversity among the rice genotypes. To identify the informative (positive) markers affecting the morphological characteristics, regression analysis was performed. A total of 16 informative markers were detected under both culture conditions which are recommended for drought tolerance in the breeding programs.

Keywords: Informative marker, QTL, Rice, SSR, Water deficient

*Corresponding author: hossein.sabouri@ghec.ac.ir