



دانشگاه گیلان
دانشکده علوم کشاورزی

تحقیقات غلات

دوره هفتم / شماره اول / بهار ۱۳۹۶ (۱-۱۶)

تجزیه ارتباط و ساختار بخشی از ذخایر ژنتیکی برنج (*Oryza sativa* L.) بر اساس نشانگرهای ریزماهواره

حیدر عزیزی^۱، علی اعلمی^{۲*}، مسعود اصفهانی^۳ و علی اکبر عبادی^۴

تاریخ دریافت: ۹۴/۴/۲

تاریخ پذیرش: ۹۴/۸/۱۶

چکیده

ارزش اقتصادی یک رقم به صفات مختلف آن بستگی دارد و از این رو اطلاع دقیق از رفتار ژنتیکی و شناسایی مکان‌های ژنومی دخیل در کنترل این صفات می‌تواند به به‌نژادگر در اصلاح ارقام کمک کند. در این تحقیق، ارتباط و پیوستگی بین ۲۵ نشانگر ریزماهواره با برخی از صفات مهم زراعی و مرفولوژیک در ۱۲۱ لاین و رقم مختلف برنج از طریق مدل‌های ارتباطیابی شامل مدل خطی عمومی (GLM) و مدل خطی مخلوط (MLM) با استفاده از نرم‌افزارهای Structure و Tassel مورد ارزیابی قرار گرفت. بر اساس ۲۵ نشانگر ریزماهواره مورد استفاده در این مطالعه، ساختار ژنتیکی جمعیت به پنج زیرجمعیت فرعی ($K=5$) تقسیم شد که نتایج حاصل از رسم بارپلات نیز آن را تایید کرد. در تجزیه ارتباطی با دو روش GLM و MLM، به ترتیب ۲۶ و ۳۰ نشانگر، ارتباط معنی‌داری را با صفات مورد مطالعه نشان دادند و تغییرات قابل توجهی از این صفات را توجیه کردند. وجود نشانگرهای مشترک در میان برخی صفات بررسی شده مانند ارتباط معنی‌دار نشانگر RM5 با صفات طول و عرض برگ پرچم و نشانگر RM3355 با صفات تعداد روز تا ۵۰ درصد گلدهی و ارتفاع بوته می‌تواند ناشی از آثار پلیوتروپی و یا پیوستگی نواحی ژنومی دخیل در این صفات باشد. همچنین، نشانگرهای RM190 و RM6080 با ضریب تبیین بالا به ترتیب با صفات طول شلتوک و عملکرد دانه منتسب شدند که می‌توانند پس از آزمایش‌های تکمیلی و تأیید نتایج، به منظور شناسایی ژن‌های رمزکننده این صفات، ناحیه ژنومی مربوطه اشباع و توالی‌یابی شوند.

واژه‌های کلیدی: ساختار ژنتیکی، جمعیت، پلیوتروپی، عدم تعادل لینکاژی

۱- دانش‌آموخته دکتری، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده علوم کشاورزی دانشگاه گیلان، رشت، ایران (آدرس جدید: استادیار پژوهش، بخش تحقیقات چغندر قند، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان آذربایجان غربی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، ارومیه، ایران)

۲- استادیار، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده علوم کشاورزی دانشگاه گیلان، رشت، ایران

۳- استاد، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده علوم کشاورزی دانشگاه گیلان، رشت، ایران

۴- استادیار پژوهش، بخش اصلاح و تهیه بذر، موسسه تحقیقات برنج کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، رشت، ایران

* نویسنده مسئول: ali_aalami@guilan.ac.ir

مقدمه

برنج به‌عنوان غذای نیمی از جمعیت دنیا، گیاهی از خانواده گندمیان (Gramineae یا Poaceae)، زیرتیره Oryzoideae، جنس *Oryza*، دیپلوئید و دارای $2n=24$ کروموزوم می‌باشد. برنج گیاهی خودگشن است که میزان دگرگشتی آن بین صفر تا ۵ درصد است. جنس *Oryza* از ۲۵ گونه تشکیل شده که ۲۳ گونه آن وحشی و دو گونه مهم زراعی و معروف آن *O. sativa* و *O. glaberrima* می‌باشد که مهم‌ترین تفاوت‌های آن‌ها فقدان انشعاب ثانویه خوشه و وجود کرک بر روی پوشینه در گونه *glaberrima* است. برنج زراعی دارای سه زیر گونه به نام‌های هندی (ایندیکا)، ژاپنی (ژاپونیکا) و جاوه‌ای (جاوانیکا) می‌باشد که هر یک دارای ویژگی‌های مورفولوژیکی خاصی هستند (Zhu et al., 1998; Tripathi et al., 2011). برنج با حدود ۱۶۴ میلیون هکتار سطح زیر کشت در سال ۲۰۱۳، دارای متوسط عملکرد ۴/۴ تن در هکتار و تولید کل حدود ۷۲۰ میلیون تن بوده است (FAO, 2013).

کیفیت دانه در برنج نیز همانند سایر غلات، اهمیت بسیار زیادی دارد و به خصوص در بازار پسندی و ارزش تجاری آن بسیار مؤثر است. یکی از جنبه‌های مربوط به کیفیت دانه برنج، کیفیت ظاهری آن می‌باشد که خود شامل طول، عرض، ضخامت، نسبت بین آن‌ها می‌باشد، که همه آن‌ها در ارزش اقتصادی و بازارپسندی برنج مؤثرند. از طرفی با توجه به اینکه در ایران، برنج یکی از محصولات استراتژیک بوده و طی دو دهه اخیر میزان مصرف سرانه برنج (از ۱۵ تا ۲۰ کیلوگرم به ۳۸ تا ۴۰ کیلوگرم افزایش یافته است) و الگوی مصرف و تغذیه مردم تغییر یافته و مصرف برنج به‌عنوان یکی از مواد اولیه اصلی و اساسی غذای روزانه، وارد سبد خانوار شده است. بنابراین تولید ارقام با عملکرد دانه بالا و کیفیت دانه مناسب، عملی کردن الگوی مکانیزاسیون در مراحل مختلف فرآوری برنج از طریق اصلاح ویژگی‌های فیزیکی و ظاهری دانه و سایر ویژگی‌های زراعی، مورفولوژیک و فیزیولوژیک مرتبط با عملکرد دانه و شناخت ماهیت ژنتیکی آن‌ها ضروری به نظر می‌رسد.

اگرچه اطلاعات کمی در رابطه با معماری ژنتیکی صفات مهم و به ویژه صفاتی که بصورت کمی به ارث می‌رسند، وجود دارد (Mackay et al., 2009)، ولی در

حال حاضر به منظور پی بردن به ماهیت ژنتیکی صفات کمی، روش‌های مختلف ژنومیکس امکان کالبد شکافی دقیق آن‌ها را فراهم ساخته است (Tuberosa et al., 2010; Semagn et al., 2002). نقشه‌یابی پیوستگی (Linkage mapping) و نقشه‌یابی ارتباطی (Association mapping) یا نقشه‌یابی عدم تعادل پیوستگی از روش‌های مهم ژنتیک کمی هستند که اکثراً جهت فهم ارتباط بین یک ژنوتیپ و یک فنوتیپ خاص مورد استفاده قرار می‌گیرند. اگرچه موفقیت نقشه‌یابی پیوستگی در شناسایی QTLها برای صفات متعدد در بسیاری از گونه‌ها به اثبات رسیده است (Mauricio et al., 2001; Doerge, 2002; Maccaferri et al., 2012; Pasam et al., 2010)، ولی با توجه به اینکه منطقه QTL شناسایی شده بیشتر از چند سانتی‌مورگان و شامل صدها ژن می‌باشد، شناسایی QTLهای کاندیدی مناسب را با مشکل مواجه می‌سازد.

همچنین ساخت جمعیت‌های نقشه‌یابی مانند لاین‌های اینبرد نوترکیب (RILs) از طریق تلاقی‌های کنترل شده و سپس چندین نسل خودگشتی زمان‌بر بوده و این نیز خود یکی دیگر از محدودیت‌های استفاده از نقشه‌های پیوستگی می‌باشد. نقشه‌یابی ارتباطی به عنوان یک روش جایگزین و یا مکمل جهت شناسایی ارتباط بین نشانگر و صفت، دارای مزایای زیادی نسبت به نقشه‌یابی QTL است که از آن جمله می‌توان به افزایش وضوح QTL، استفاده از ژرمپلاسم طبیعی و افزایش پوشش آلی اشاره نمود (Yu et al., 2006).

روش نقشه‌یابی ارتباطی علاوه بر نقشه‌یابی دقیق‌تر، با ژرمپلاسم‌های دارای تنوع ژنتیکی بیشتر سازگار بوده و اجازه نقشه‌یابی چندین صفت بطور همزمان را می‌دهد. بنابراین، برای هر صفت مورد نظر نیازی به ایجاد جمعیت‌های دو والدی که خود باعث هزینه اضافی جهت ارزیابی ژنوتیپی و فنوتیپی می‌شود، نیست. همچنین این روش به‌طور گسترده‌ای در ژنتیک انسانی و جانوری که در آن‌ها ایجاد جمعیت‌های در حال تفرق بزرگ غیر ممکن می‌باشد، استفاده می‌شود (DeWan et al., 2006).

تا کنون مطالعات قابل توجهی در مورد تعیین جایگاه‌های ژنی صفات مختلف با استفاده از نقشه‌یابی پیوستگی در برنج صورت گرفته است (Sabouri et al., 2012; Mardani et al., 2013; Kovi et al., 2015). اگرچه از روش مکان‌یابی ارتباطی نیز به‌منظور شناسایی

استخراج DNA و ارزیابی ژنوتیپی

از گیاهچه‌ها در مرحله ۴-۵ برگگی نمونه‌های برگگی انتخاب و DNA ژنومی آن‌ها با استفاده از CTAB استخراج شد (Rogers and Bendich, 1985). کیفیت و کمیت DNA استخراج شده به ترتیب با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز یک درصد و اسپکتوفتومتری ارزیابی شد. برای ثبت داده‌های ژنوتیپی، ۲۵ نشانگر ریزماهواره (جدول ۳) بر اساس توازن در پوشش مناسب ژنوم و وضوح در باندهای چندشکل تولیدی انتخاب شد. واکنش PCR در حجم نهایی ۱۰ میکرولیتر حاوی تک DNA پلی‌مراز (با غلظت نهایی ۰/۵ واحد) به میزان ۰/۱۵ میکرولیتر، بافر PCR (با غلظت ۱۰ برابر) به مقدار ۱ میکرولیتر، $MgCl_2$ (با غلظت ۵۰ میلی مولار) به میزان ۰/۴۸ میکرولیتر، dNTPs (با غلظت ۵ میلی مولار) به مقدار ۰/۶ میکرولیتر، آغازگرهای مستقیم و معکوس (با غلظت ۱۰ میکرو مولار) هر کدام به مقدار ۰/۴ میکرولیتر، آب دیونیزه استریل به مقدار ۴/۹۷ میکرولیتر و ۲ میکرولیتر DNA با غلظت ۵۰ نانوگرم بود. برنامه دمایی دستگاه ترموسایکلر شامل واسرشت‌سازی اولیه به مدت ۴ دقیقه در دمای $94^{\circ}C$ و بعد ۳۵ چرخه حرارتی به صورت ۴۵ ثانیه در دمای $94^{\circ}C$ جهت واسرشت‌سازی، ۴۵ ثانیه در دمای $55^{\circ}C$ به منظور اتصال آغازگرها، یک دقیقه در دمای $72^{\circ}C$ جهت بسط آغازگرها و در نهایت ۵ دقیقه در دمای $72^{\circ}C$ به منظور تکمیل فرآیند بسط (بسط نهایی) انجام گرفت. به منظور اختصاصی‌تر شدن اتصال آغازگرها به DNA الگو و جلوگیری از اتصال غیرتخصصی آن‌ها و نیز حذف نوارهای شبه‌ریزماهواره، برنامه دمایی دستگاه به صورت Touch down انجام شد، به طوری که دمای مرحله اتصال آغازگرها در ده چرخه اول $65^{\circ}C$ در نظر گرفته شد و در هر چرخه یک درجه سلسیوس از این دما کاسته شد تا به دمای ۵۵ درجه سلسیوس رسید و به دنبال آن، ۲۵ چرخه حرارتی باقیمانده با همین دما انجام شد. جهت تفکیک فرآورده‌های تکثیر شده و ارزیابی تنوع موجود در ارقام مورد مطالعه، از ژل‌های پلی‌اکریلامید ۶ درصد استفاده شد و به منظور مشاهده نوارها رنگ‌آمیزی ژل با نیترات نقره صورت گرفت. برای تعیین اندازه باندها نیز از نشانگر اندازه O'GeneRulerTM (شرکت فرمنتاز) استفاده شد.

آل‌های مطلوب برای صفات مختلف در برنج مانند عملکرد (Agrama et al., 2007; Vanniarajan et al., 2012)، کیفیت دانه (Jin et al., 2010)، مقاومت به تنش‌های زیستی (Jia et al., 2012) و غیرزیستی (Zheng et al., 2015) استفاده شده است، ولی نسبتاً گزارشات کمتری با استفاده از این روش برای صفات مهم برنج به خصوص برای ژنوتیپ‌های ایرانی وجود دارد. بر این اساس در این تحقیق در نظر است نقشه‌یابی ارتباطی برای برخی از خصوصیات مهم آگرومورفولوژیک با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره‌ای روی بخشی از ژرم‌پلاسم برنج که بیشتر ژنوتیپ‌های بومی و اصلاح‌شده ایران را در بر می‌گیرد، انجام شود.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و ارزیابی‌های فنوتیپی

در این مطالعه، تعداد ۱۲۱ ژنوتیپ مختلف برنج (جدول ۱) شامل ۳۳ رقم محلی، ۲۶ لاین اصلاح‌شده ایرانی و ۶۲ لاین اصلاح‌شده خارجی بود که در قالب طرح لاتیس ساده 11×11 با دو تکرار در مزرعه تحقیقاتی مؤسسه تحقیقات برنج کشور، رشت، با طول و عرض جغرافیایی به ترتیب ۴۹ درجه و ۳۶ دقیقه شرقی و ۳۷ درجه و ۱۶ دقیقه شمالی کشت شد.

خزانه‌گیری در فروردین و نشاکاری در اردیبهشت ماه سال زراعی ۱۳۹۳ و در مرحله ۴-۵ برگگی صورت گرفت. کلیه عملیات زراعی از قبیل آبیاری، مبارزه با علف‌های هرز (وجین بصورت دستی)، مبارزه با آفات (کرم ساقه‌خوار و برگ‌خوار) و کودپاشی مطابق روش‌های معمول انجام شد. در طول دوره رشد در زمان‌های مناسب بر اساس سیستم ارزیابی استاندارد (SES) مؤسسه تحقیقات بین‌المللی برنج (IRRI, 2002)، ارزیابی‌های لازم برای صفاتی مانند تعداد روز تا ۵۰ درصد گلدهی، تعداد پنجه بارور، ارتفاع بوته (سانتی‌متر)، طول خوشه (سانتی‌متر)، طول و عرض برگ پرچم (سانتی‌متر)، طول و عرض شلتوک (میلی‌متر)، تعداد دانه پر و پوک، وزن صد دانه (گرم) و در نهایت عملکرد دانه (تن در هکتار) انجام شد. کلیه ارزیابی‌ها روی ده بوته تصادفی از هر کرت انجام شد.

جدول ۱- ارقام و لاین‌های برنج مورد استفاده در این تحقیق

Table 1. Rice varieties and lines used in this study

ژنوتیپ Genotype	نوع Type	منشأ Origin	ژنوتیپ Genotype	نوع Type	منشأ Origin
بینام Binam	محلی Local	گیلان، ایران Guilan, Iran	سنگ طارم Sang-e-Tarom	محلی Local	مازندران، ایران Mazandaran, Iran
عنبربو Anbarboo	محلی Local	گیلان، ایران Guilan, Iran	اهلمی طارم Ahlami-Tarom	محلی Local	مازندران، ایران Mazandaran, Iran
دم‌سیاه سلیمان‌داراب Domsiah-Soleimandarab	محلی Local	گیلان، ایران Guilan, Iran	طارم منطقه Tarom-Mantagheh	محلی Local	مازندران، ایران Mazandaran, Iran
گرده رامهرمز Gardeh-Ramhormoz	محلی Local	گیلان، ایران Guilan, Iran	زیره Zireh	محلی Local	گیلان، ایران Guilan, Iran
هاشمی Hashemi	محلی Local	گیلان، ایران Guilan, Iran	موسی طارم Mousa-Tarom	محلی Local	مازندران، ایران Mazandaran, Iran
شاه‌پسند Shahpasand	محلی Local	گیلان، ایران Guilan, Iran	دیلمانی Deilamani	محلی Local	مازندران، ایران Mazandaran, Iran
دم‌سیاه Domsiah	محلی Local	گیلان، ایران Guilan, Iran	قشنگه Ghashange	محلی Local	گیلان، ایران Guilan, Iran
دم‌سفید Domsefid	محلی Local	گیلان، ایران Guilan, Iran	گرده Gardeh	محلی Local	مازندران، ایران Mazandaran, Iran
غریب Gharib	محلی Local	گیلان، ایران Guilan, Iran	طارم محلی Tarom-Mahali	محلی Local	مازندران، ایران Mazandaran, Iran
موسی طارم Mousa-Tarom	محلی Local	گیلان، ایران Guilan, Iran	طارم امیری Tarom-Amiri	محلی Local	مازندران، ایران Mazandaran, Iran
دم‌زرد Domzard	محلی Local	گیلان، ایران Guilan, Iran	چمپا اهواز Champa Ahvaz	محلی Local	خوزستان، ایران Khuzestan, Iran
حسن‌سرای Hassansaraee	محلی Local	گیلان، ایران Guilan, Iran	خزر Khazar	اصلاح‌شده Improved	گیلان، ایران Guilan, Iran
حسنی Hassani	محلی Local	گیلان، ایران Guilan, Iran	کوهسار Koohsar	اصلاح‌شده Improved	مازندران، ایران Mazandaran, Iran
چمپا‌بودار Champabodar	محلی Local	گیلان، ایران Guilan, Iran	گیل ۱ Gil 1	اصلاح‌شده Improved	گیلان، ایران Guilan, Iran
حسن‌سرای آتشگاه Hassansaraee Atashgah	محلی Local	گیلان، ایران Guilan, Iran	هویزه Hoveizeh	اصلاح‌شده Improved	خوزستان، ایران Khuzestan, Iran
شاه‌پسند مازندران Shahpasand-Mazandaran	محلی Local	مازندران، ایران Mazandaran, Iran	شیرودی Shiroodi	اصلاح‌شده Improved	مازندران، ایران Mazandaran, Iran
حسن‌سرای پیچیده‌غلاف Hasansaraee Pichideh Ghalaf	محلی Local	گیلان، ایران Guilan, Iran	کشوری Keshvari	حاصل رقم باسماتی Derived from Basmati	مازندران، ایران Mazandaran, Iran
دم‌سرخ Domsorkh	محلی Local	گیلان، ایران Guilan, Iran	دانیال Danial	اصلاح‌شده Improved	خوزستان، ایران Khuzestan, Iran
سالاری Salari	محلی Local	گیلان، ایران Guilan, Iran	پژوهش Pajouhesh	اصلاح‌شده Improved	مازندران، ایران Mazandaran, Iran
غریب سیاه‌ریحانی Gharib-Siah-Reihani	محلی Local	گیلان، ایران Guilan, Iran	جلودار Jelodar	اصلاح‌شده Improved	مازندران، ایران Mazandaran, Iran
علی کاظمی Ali Kazemi	محلی Local	گیلان، ایران Guilan, Iran	پردیس Pardis	اصلاح‌شده Improved	مازندران، ایران Mazandaran, Iran
عنبروری اهواز Anbouri-Ahvaz	محلی Local	خوزستان، ایران Khuzestan, Iran	زاینده‌رود Zayanderoud	اصلاح‌شده Improved	اصفهان، ایران Esfahan, Iran
سازندگی Sazandegi	اصلاح‌شده Improved	اصفهان، ایران Esfahan, Iran	IR4491-89-1	وارداتی Foreign	ایری، فیلیپین IRRI

جدول ۱- ادامه					
ژنوتیپ	نوع	منشأ	ژنوتیپ	نوع	منشأ
Genotype	Type	Origin	Genotype	Type	Origin
قائم	اصلاح شده	مازندران، ایران	تتپ	وارداتی	مصر
Ghaem	Improved	Mazandaran, Iran	TETEP	Foreign	Egypt
ساحل	اصلاح شده	مازندران، ایران	Usen	وارداتی	مصر
Sahel	Improved	Mazandaran, Iran		Foreign	Egypt
فجر	حاصل لاین IR7328	مازندران، ایران	NP-125	وارداتی	ایری، فیلیپین
Fajr	Obtained from IR7328	Mazandaran, Iran		Foreign	IRRI
سپیدرود	دم سیاه / IR8	گیلان، ایران	IR30	IR1541-102-6-3//IR20*4/ <i>O.nivara</i>	ایری، فیلیپین
Sepidroud	Domsiah/IR8	Guilan, Iran			IRRI
شفق	حاصل رقم باسامتی	مازندران، ایران	IR50	وارداتی	ایری، فیلیپین
Shafagh	Obtained from Basmati	Mazandaran, Iran	Mazandaran IR50	Foreign	IRRI
تابش	موتاسیون	مازندران، ایران	IR58	IR28/Kwang-Chang-Ai//IR36	ایری، فیلیپین
Tabesh	Mutation	Mazandaran, Iran			IRRI
درفک	سالاری / سپیدرود	گیلان، ایران	شماره ۳۰ مقایسه آمل	وارداتی	ایری، فیلیپین
Dorfak	Salari/Sepidroud	Guilan, Iran	Amol, No. 30	Foreign	IRRI
بجار	دم سیاه محلی / IR8	گیلان، ایران	شماره ۲۲۹ مقایسه آمل	وارداتی	ایری، فیلیپین
Bejar	Local Domsiah/IR8	Guilan, Iran	Amol, No. 229	Foreign	IRRI
نعمت	آمل ۳ / سنگ طارم	مازندران، ایران	IR67017-71-3-2	وارداتی	ایری، فیلیپین
Nemat	Amol3/Sange Tarom	Mazandaran, Iran		Foreign	IRRI
ندا	سنگ طارم / حسن سرایی	مازندران، ایران	رستورر شماره ۵	وارداتی	ایری، فیلیپین
Neda	Sange Tarom/Hassansaraie	Mazandaran, Iran	Restorer, No. 5	Foreign	IRRI
دشت	آمل ۱ / IR29	مازندران، ایران	IRON-70-7053-7	وارداتی	ایری، فیلیپین
Dasht	Amol1/IR29	Mazandaran, Iran		Foreign	IRRI
پویا	موتاسیون	مازندران، ایران	Canturypatna	وارداتی	ایری، فیلیپین
Pooya	Mutation	Mazandaran, Iran		Foreign	IRRI
کادوس	وارداتی	گیلان، ایران	IRON-13-VE لاین ۳۰۴	وارداتی	ایری، فیلیپین
Kadous	Foreign	Guilan, Iran	Line304, IRON-13-VE	Foreign	IRRI
GH3	هیبرید	گیلان، ایران	IRON-13-VE لاین ۳۰۵	وارداتی	ایری، فیلیپین
	Hybrid	Guilan, Iran	Line305, IRON-13-VE	Foreign	IRRI
IR28	IR833-6-2-1-1//IR1561-149-1//IR24*4/ <i>O.nivara</i>	ایری، فیلیپین	Norin-22	وارداتی	ژاپن
		IRRI		Foreign	Japan
IR36	IR1561-228-1-2//IR1737//CR94-13	ایری، فیلیپین	IR25571	وارداتی	ایری، فیلیپین
		IRRI		Foreign	IRRI
IR50	IR215314-1-6-2//IR28//IR36	ایری، فیلیپین	Ciza-181	وارداتی	مصر
		IRRI		Foreign	Egypt
IR60	وارداتی	ایری، فیلیپین	آرژانتین-۱	وارداتی	مصر
	Foreign	IRRI	Argentina-1	Foreign	Egypt
Dcl	وارداتی	مصر	IR66233-169-3-3	وارداتی	ایری، فیلیپین
	Foreign	Egypt		Foreign	IRRI
مصر CY	وارداتی	مصر	IR74718-24-2-3	وارداتی	ایری، فیلیپین
Egypt CY	Foreign	Egypt		Foreign	IRRI
مصر DC	وارداتی	مصر	IR74721-199-1-3	وارداتی	ایری، فیلیپین
Egypt DC	Foreign	Egypt		Foreign	IRRI
CN-21	وارداتی	مصر	IR70445-86-2-1	وارداتی	ایری، فیلیپین
	Foreign	Egypt		Foreign	IRRI
لاین ۳۳۸	وارداتی	ایری، فیلیپین	IR74719-68-2-3	وارداتی	ایری، فیلیپین
Line 338	Foreign	IRRI		Foreign	IRRI

جدول ۱- ادامه			Table 1. Continued		
منشأ	نوع	ژنوتیپ	منشأ	نوع	ژنوتیپ
Origin	Type	Genotype	Origin	Type	Genotype
ایری، فیلیپین	وارداتی	IR75481-108-3	ایری، فیلیپین	وارداتی	لاین ۱۲۰ Line 120
IRRI	Foreign		IRRI	Foreign	
ایری، فیلیپین	وارداتی	IR74720-13-1-2	ژاپن	وارداتی	فوجی-می-نوری Fujiminori
IRRI	Foreign		Japan	Foreign	
ایری، فیلیپین	وارداتی	IR75481-123-3	ایری، فیلیپین	وارداتی	لاین ۶ Line 6
IRRI	Foreign		IRRI	Foreign	
ایری، فیلیپین	وارداتی	IR74719-145-2-3	ایری، فیلیپین	وارداتی	لاین ۸۳۹ Line 839
IRRI	Foreign		IRRI	Foreign	
ایری، فیلیپین	وارداتی	IR74720-85-1-2	ایری، فیلیپین	وارداتی	لاین ۸۳۰ Line 830
IRRI	Foreign		IRRI	Foreign	
ایری، فیلیپین	وارداتی	IR75481-146-3	ایری، فیلیپین	وارداتی	لاین ۸۳۱ Line 831
IRRI	Foreign		IRRI	Foreign	
ایری، فیلیپین	وارداتی	IR71735-6-3-3	ایری، فیلیپین	وارداتی	لاین ۸۳۳ Line 833
IRRI	Foreign		IRRI	Foreign	
ایری، فیلیپین	وارداتی	E1	ایری، فیلیپین	وارداتی	لاین ۸۳۴ Line 834
IRRI	Foreign		IRRI	Foreign	
ایری، فیلیپین	وارداتی	E2	ایری، فیلیپین	وارداتی	لاین ۸۳۵ Line 835
IRRI	Foreign		IRRI	Foreign	
ایری، فیلیپین	وارداتی	IR?-15092-RT1031-62	ایری، فیلیپین	وارداتی	IR70445-146-3-3
IRRI	Foreign		IRRI	Foreign	
ایری، فیلیپین	وارداتی	لاین ۲۱۳ Line 213	ایری، فیلیپین	وارداتی	IR67418-110-3-2-2-2
IRRI	Foreign		IRRI	Foreign	
گیلان، ایران	هیبرید	GH1	ایری، فیلیپین	وارداتی	IR71739-24-3-5
Guilan, Iran	Hybrid		IRRI	Foreign	
گیلان، ایران	هیبرید	GH2	ایری، فیلیپین	وارداتی	IR75489-15-2-1
Guilan, Iran	Hybrid		IRRI	Foreign	
ایری، فیلیپین	وارداتی	IR66232-88-2-2-1	ایری، فیلیپین	وارداتی	IR67015-49-2-6
IRRI	Foreign		IRRI	Foreign	

تجزیه و تحلیل داده‌ها

امتیازدهی باندها به صورت یک برای وجود باند و صفر برای عدم وجود باند انجام گرفت. ماتریس صفر و یک به منظور ارزیابی ساختار جمعیت مورد بررسی استفاده شد. میزان اطلاعات چند شکلی (PIC) از طریق رابطه (۱) محاسبه شد (Anderson *et al.*, 1993):

$$PIC = 1 - \sum_{i=1}^n P_i^2 \quad (1)$$

که در آن، P_i فراوانی آلل نام و n تعداد مکان‌ها است. دسته‌بندی دقیق ژنوتیپ‌ها به زیرجمعیت‌های مناسب و تشخیص ژنوتیپ‌های مختلط با استفاده از روش بی‌زین در نرم‌افزار Structure 2.3.4 انجام گرفت (Pritchard *et al.*, 2000). این روش هر یک از ژنوتیپ‌ها را با یک احتمال و طوری به زیرجمعیت‌های فرضی منتسب می‌کند که در هر زیرجمعیت میزان عدم تعادل پیوستگی حداقل

و تعادل مرحله گامتی حداکثر باشد. مقادیر اولیه K (زیرجمعیت فرضی اولیه) بین ۱ تا ۱۰ در نظر گرفته شد و جهت افزایش دقت برای هر کدام از زیر جمعیت‌ها ۵ تکرار منظور شد. برای این منظور از مدل Admixture و استقلال فراوانی آللی با ۱۰۰۰۰ تکرار آزمایش (Burn-in) و ۱۰۰۰۰ تکرار MCMC (Markov Chain Monte Carlo) استفاده گردید تا منحنی حداکثر درست‌نمایی حاصل شود. نرم‌افزار Structure برای هر مقدار K (تعداد واقعی زیر جمعیت) یک ماتریس به نام Qst را محاسبه می‌کند که این ماتریس شامل برآورد ضرایب احتمال عضویت هر لاین در هر یک از زیرجمعیت‌ها می‌باشد. در بارپلات حاصل، وقتی درصد عضویت یک ژنوتیپ به یک کلاستر بیشتر یا مساوی ۰/۷ باشد، ژنوتیپ به آن کلاستر نسبت داده می‌شود، ولی در صورتی که درصد عضویت آن کمتر از این مقدار باشد، به‌عنوان ژنوتیپ ترکیبی (مخلوط

که در طول تاریخچه تکاملی گیاه انباشته شده است، در نظر گرفته می‌شود، در صورتی که در روش‌های معمول نقشه‌یابی فقط در تعدادی از نسل‌های تلاقی یا خودگشتی، میوز اتفاق می‌افتد. بنابراین وجود تنوع زیاد در جمعیت‌های مورد بررسی جهت وضوح و دقت بیشتر نتایج حاصله ضروری به نظر می‌رسد که این تنوع از نظر فنوتیپی و ژنوتیپی در جمعیت مورد مطالعه در این تحقیق مشاهده می‌شود. اله‌قلی‌پور و همکاران (Allahgholipour *et al.*, 2004)، رحیمی و همکاران (Rahimi *et al.*, 2010) و کیانی و نعمت‌زاده (Kiani and Nematzadeh, 2012) نیز در مطالعات مشابهی روی برنج، سطح بالایی از تنوع را برای بسیاری از ژنوتیپ‌های مورد بررسی گزارش کردند.

ارزیابی تنوع و ساختار ژنتیکی

به‌منظور ارزیابی تنوع و ساختار ژنتیکی ۱۲۱ ژنوتیپ مختلف برنج از ۲۵ جفت آغازگر ریزماهواره با توزیع و پوشش ژنومی مناسب استفاده شد. در کل ۹۸ مکان توسط آغازگرهای مورد استفاده تکثیر شد که از این تعداد ۸۳ مکان (۸۴/۷ درصد) چند شکل بودند. محتوای اطلاعات چندشکل (PIC) از ۰/۲۹ (آغازگر RM282) تا ۰/۶۴ (آغازگر RM11) با میانگین ۰/۴۶ متغیر بود (جدول ۳). بالا بودن چند شکلی به‌دست آمده در پژوهش حاضر را می‌توان به کارایی بالای این نشانگرها، وسعت مناطق جغرافیایی منشأ ژنوتیپ‌های مورد بررسی و نیز تعداد زیاد ژنوتیپ‌های مورد بررسی نسبت داد (Mokrani *et al.*, 2002). از آنجا که نواحی ریزماهواره‌ای در یوکاریوت‌ها با فراوانی بالا در سراسر ژنوم پراکنده‌اند، بنابراین استفاده از این روش می‌تواند سطح بالایی از چندشکلی را آشکار سازد (Zietkiewicz *et al.*, 1994). در این بررسی در کل مقادیر PIC برای بسیاری از نشانگرهای مورد استفاده زیاد بود که نشان‌دهنده انتخاب صحیح و کارایی بالای این نشانگرها می‌باشد. مقادیر بالای PIC و چندشکلی برای نشانگرهای ریزماهواره در مطالعات دیگری نیز گزارش شده است (Zhou *et al.*, 2012; Das *et al.*, 2013).

شده) تعریف می‌شود (Spataro *et al.*, 2011). تعداد واقعی زیرجمعیت (K) بر اساس روش ایوانو و همکاران (Evanno *et al.*, 2005) مشخص شد. این روش بر اساس آماره ΔK استوار است که شیب تابع احتمالی $\ln P(D)$ را در نقطه‌ای می‌شکند که تعداد K فرضی در آن نقطه دارای حداکثر احتمال باشد.

شناسایی نشانگرهای مرتبط و دارای ارتباط معنی‌دار با صفات مورد ارزیابی، بر اساس مدل خطی عمومی (GLM) وابسته به ماتریس Q (ماتریس ضرایب ساختار جمعیت) و مدل خطی مخلوط (MLM) وابسته به ماتریس Q+K (K: ماتریس روابط خویشاوندی) جهت جلوگیری از ارتباط کاذب بین نشانگر- صفت با استفاده از نرم‌افزار TASSEL 3.0 انجام گرفت. همچنین به‌منظور محاسبه آماره‌های توصیفی از نرم‌افزار Minitab ver.16 استفاده شد.

نتایج و بحث

آماره‌های توصیفی

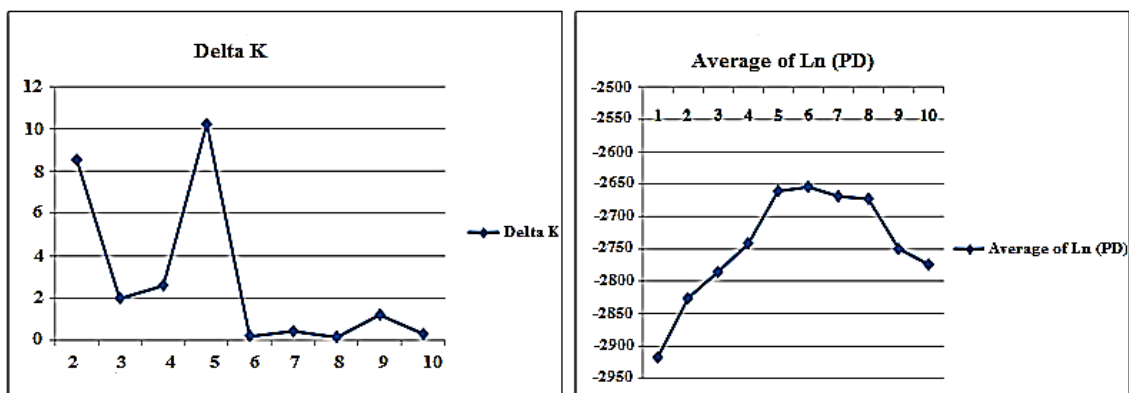
شاخص‌های مهم توزیع مشاهدات صفات مورد مطالعه شامل حداقل، حداکثر، میانگین، دامنه تغییرات و ضریب تغییرات فنوتیپی در جدول ۲ ارائه شده است. بر اساس نتایج به‌دست آمده، بالاترین ضریب تغییرات مربوط به تعداد دانه پوک در خوشه و عملکرد دانه (به‌ترتیب ۴۵/۴ و ۲۶/۷ درصد) بود. نتایج این مطالعه بر اساس ارزیابی فنوتیپی و محاسبه شاخص‌های مختلف پراکندگی نشان داد که ژرم‌پلاسم برنج مورد مطالعه دارای تنوع بالایی از نظر بیشتر صفات می‌باشد که این تنوع می‌تواند در مطالعه تجزیه ارتباطی حاضر مفید واقع شود، زیرا در روش تجزیه ارتباطی عامل‌های مرتبط با چندشکلی‌های فنوتیپی در جمعیت‌های متنوع‌تر از جمعیت‌های حاصل از تلاقی دو والد مشخص همانند ژنوتیپ‌های غیرخویشاوند جستجو می‌شوند. بنابراین، وقوع وقایع نوترکیبی در طول تاریخ تکاملی این جمعیت‌های با تنوع زیاد که معمولاً چندین نسل دورتر از جد مشترک خود هستند، باعث شکست بلوک‌های عدم تعادل پیوستگی درون ژنوم می‌شوند. به عبارت دیگر، در این نوع نقشه‌یابی تمام رویدادهای میوزی

جدول ۲- میانگین، حداقل، حداکثر، دامنه تغییرات و ضریب تغییرات فنوتیپی صفات مورد بررسی در ۱۲۱ ژنوتیپ برنج
Table 2. Mean, minimum, maximum, range and phenotypic coefficient of variation of assessed traits in 121 rice genotypes.

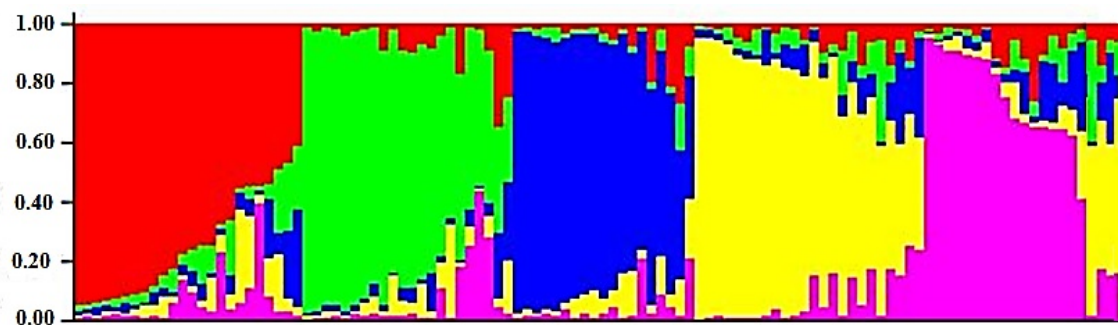
صفت Trait	میانگین Mean	حداقل Minimum	حداکثر Maximum	دامنه تغییرات Range	ضریب تغییرات (%) Coefficient of variation (%)
روز تا ۵۰ درصد گلدهی Days to 50% flowering	99.5±0.61	71.0	128.0	57.0	10.13
تعداد پنجه Number of tiller	15.1±0.18	10.0	28.0	18.0	18.41
ارتفاع بوته Plant height (cm)	118.8±1.23	75.0	176.0	101.0	16.09
طول خوشه Panicle length (cm)	26.3±0.16	20.0	33.0	13.0	9.70
طول برگ پرچم Flag leaf length (cm)	27.8±0.26	18.3	43.3	25.0	14.78
عرض برگ پرچم Flag leaf width (cm)	1.12±0.008	0.8	1.6	0.8	11.61
تعداد دانه پر Number of filled grain	111.5±1.55	59.0	166.0	107.0	21.66
تعداد دانه پوک Number of unfilled grain	23.3±0.68	10.0	67.0	57.0	45.45
طول شلتوک Paddy length (mm)	10.1±0.07	7.2	12.5	5.3	11.16
عرض شلتوک Paddy width (mm)	2.54±0.02	2.1	3.6	1.5	13.59
وزن صد دانه 100-grain weight (g)	2.48±0.02	1.8	3.8	2.0	13.99
عملکرد دانه Grain yield (t.ha ⁻¹)	4.3±0.06	2.0	7.45	5.45	26.74

در این تحقیق ساختار ژنتیکی جمعیت و چگونگی آن و تعیین تعداد مناسب زیرجمعیت‌ها به منظور استفاده از آن به عنوان کوواریت در انجام تجزیه ارتباطی بر اساس روش بیزین در نرم‌افزار Structure انجام شد. بر اساس نتایج حاصل، پنج زیرجمعیت احتمالی ($K=5$) در ژرم‌پلاسم مورد مطالعه شناسایی شد (شکل ۱) که به عنوان K بهینه در تخمین ساختار جمعیت و محاسبه ماتریس سهم عضویت افراد در هر کلاستر (ماتریس Q) در نظر گرفته شد. بر اساس نتایج آرایه شده در بارپلات (شکل ۲)، از کل ۱۲۱ ژنوتیپ برنج مورد مطالعه، ۳۶ ژنوتیپ (۲۹/۸ درصد) ساختار مخلوط (احتمال تعلق هر ژنوتیپ به هر دو زیر گروه کمتر از ۰/۷ است)، ۲۱ ژنوتیپ (۱۷/۴ درصد) به ساختار اول، ۱۸ ژنوتیپ به هر کدام از ساختارهای دوم و سوم (۱۴/۹ درصد)، ۱۵ ژنوتیپ به ساختار چهارم (۱۲/۴ درصد) و ۱۳ ژنوتیپ (۱۰/۷ درصد) به ساختار پنجم تعلق داشتند.

در مطالعات ژنتیکی، ساختار جمعیت که برای توضیح روابط افراد در درون و بین جمعیت‌ها استفاده می‌شود، چشم‌اندازی از روابط تکاملی افراد در یک جمعیت را آرایه می‌دهد. همچنین در مطالعات تجزیه ارتباط در حالت ایده‌آل نباید ساختاری در جمعیت مورد مطالعه وجود داشته باشد، یعنی جمعیت نباید خود به لحاظ ساختاری به زیرگروه‌ها تقسیم شود، زیرا وجود ساختار در جمعیت مورد مطالعه می‌تواند عامل بازدارنده در جهت دستیابی به نتایج قابل اعتماد باشد. در صورتی که اثر ساختار جمعیت و روابط خویشاوندی در تجزیه ارتباط در نظر گرفته نشوند، نتایج مثبت کاذب به وجود خواهد آمد (Breseghello and Sorrells, 2006). بنابراین آگاهی از ساختار جمعیت به عنوان یک پیش‌نیاز در نقشه‌یابی ارتباطی می‌تواند به منظور اجتناب از شناسایی ارتباطات مثبت دروغین بین نشانگرها و صفات استفاده شود (Pritchard and Donnelly, 2001). به همین منظور،



شکل ۱- نمودارهای دوسویه برای تعیین تعداد مناسب زیرجمعیت در ژنوتیپ‌های برنج مورد مطالعه ($K=5$) با نشانگرهای ریزماهوره
Figure 1. Bilateral charts for determination of the number of sub-population in the studied rice genotypes ($K=5$) based on microsatellite markers



شکل ۲- تجزیه کلاستر مبتنی بر مدل Bayesian برای ۱۲۱ ژنوتیپ برنج مورد مطالعه بر اساس ۲۵ مکان ریزماهوره ($K=5$). هر رنگ یک زیرجمعیت یا کلاستر را نشان می‌دهد. محور عمودی ضریب تعلق هر فرد به هر کلاستر را نشان می‌دهد.

Figure 2. Bayesian model based cluster analysis for 121 different rice genotypes using 25 microsatellite loci ($K=5$). Each colors indicate one sub-population or cluster. Vertical axis show belonging coefficient of each genotype into clusters.

جدول ۳- مشخصات نشانگرهای مورد مطالعه در این تحقیق
Table 3. Characteristics of the studied markers in this research

نشانگر Marker	کروموزوم Chromosome	موتیف Motif	توالی رفت (۵'-۳') Forward sequence	توالی آغازگر برگشت (۳'-۵') Reverse sequence	محتوای اطلاعات چند شکل Polymorphism information content
RM5	1	(GA) ₁₄	TGCAACTTCTAGCTGCTCGA	GCATCCGATCTTGATGGG	0.58
RM128	1	(GAA) ₉	AGTCTACGTGGTGTACACGTGG	TGCGGCCTGCCGTTTGTGAG	0.46
RM3774	2	(GA) ₁₈	TTTGACCTCAACTCCCAAGC	GCTCCCTCACTCACAACCTCC	0.52
RM3248	2	(CT) ₁₃	AGAAGTTGCTTTCTTGCC	CTTGCAAGGTCTGTTGCATC	0.39
RM3355	2	(CT) ₁₅	CATATGCAATTGATGTTTCG	TTAATTCCTTGGTCTCAAATG	0.61
RM6080	3	(CCT) ₉	AGAGGAAGCAAGGAGATCGC	CATCGGGAGAGAAAGAGAGC	0.34
RM16	3	(TCG) ₅ (GA) ₁₆	CGCTAGGGCAGCATCTAAA	AACACAGCAGGTACGCGC	0.49
RM593	3	(CT) ₁₅ (CA) ₁₀	CGCTAGGGCAGCATCTAAA	GACAAGAGAACATCGCTAGG	0.37
RM261	4	C ₉ (CT) ₈	CTACTTCTCCCCTTGTCG	TGTACCATCGCCAAATCTCC	0.51
RM252	4	(CT) ₁₉	TTCGCTGACGTGATAGGTTG	ATGACTTGATCCCGAGAACG	0.62
RM574	5	(GA) ₁₁	GGCGAATCTTTGCACTTG	ACGGTTTGGTAGGGTGTAC	0.29
RM593	5	(CT) ₁₅ (CA) ₁₀	TCCCGTATGTAACGTGCCA	GACAAGAGAACATCGCTAGG	0.45
RM190	6	(CT) ₁₁	TTGCAGATGTTCTTCTGATG	CAAAAACAGAGCAGATGAC	0.42
RM3330	6	(CT) ₁₅	ATTATCCCCTCTCCGCTC	AAGAAAACCTCGGATTCCTG	0.38
RM11	7	(GA) ₁₇	TCCAACATGGCAAGAGAGA	GGTGGCATTTCGATTCCAG	0.64
RM214	7	(CT) ₁₄	CTG ATG ATA GAA ACC TCT TCTC	AAG AAC AGC TGA CTT CAC AA	0.53
RM336	7	(CTT) ₁₈	GCTTAAGGACTTCTGCGAACC	CAACAGCGATCCACATCATC	0.36
RM256	8	(CT) ₂₁	GACAGGGAGTGATTGAAGGCC	GTTGATTTCCGCAAGGGC	0.47
RM223	8	(CT) ₂₆	CTTCGGCGCCGTCATCAAGGTG	CGTTGAGCAGCGCGACGTTGAC	0.31
RM288	9	(CA) ₇ (GA) ₆	CCGGTCAGTCAAGCTCTG	ACGTACGGACGTGACGAC	0.46
RM201	9	(CT) ₁₇	CTCGTTTATTACCTACAGTACC	CTACCTCCTTTCTAGACCGATA	0.59
RM228	10	(CA) ₆ (GA) ₃₆	CTACATCGGCTTAGGTGTAGCAACACG	ACTTGCTCTACTTGTGGTGAAGGACTG	0.41
RM311	10	(CT) ₃ (GTAT) ₈ (GT) ₅	GAAGCCGTCGTGAAGTTACC	GTTTCCTACCTGATCGCGAC	0.53
RM202	11	(CT) ₃₀	GCCTCGAGCATCATCATCAG	ATCAACCTGCACTTGCTGG	0.48
RM286	11	(GA) ₁₆	GATCTGCAGACTGCAGTTGC	AGCTGCAACGATGTTGTCC	0.37

عدم تعادل پیوستگی

در نقشه‌یابی ارتباطی که مکان‌یابی QTLها بر اساس عدم تعادل پیوستگی صورت می‌گیرد، علاوه بر ترکیب ساختار جمعیت، گستره عدم تعادل پیوستگی (LD) در ژنوم نیز از اهمیت اساسی برخوردار است (Al-Maskri et al., 2012). در این تحقیق، ۲/۸۲ درصد از کل نشانگرهای مطالعه شده دارای r^2 معنی‌دار و بزرگ‌تر از ۰/۱ بودند ($r^2 \geq 0.1$, P-value ≤ 0.01) (شکل ۳). عدم تعادل پیوستگی در مجموعه ژنتیکی تحت مطالعه، آنالیزهای مکان‌یابی ارتباطی را امکان‌پذیر می‌سازد. از عوامل افزایش دهنده مقدار LD می‌توان به سیستم اتوگامی، اپیستازی، نوآرایی‌های ژنومی، رانده شدن ژنتیکی، ایزولاسیون ژنتیکی، ساختار جمعیت، اندازه کوچک جمعیت، انتخاب و درجه خویشاوندی اشاره کرد.

در حالی که دگرآمیزی (آلوگامی)، تبدیل ژنی، مقادیر بالای نوترکیبی و جهش و همچنین جهش‌های دوره‌ای از عوامل کاهنده مقدار LD هستند (Gupta et al., 2005; Al-Maskri et al., 2012). در کنار ماهیت اتوگامی برنج، نوع نشانگر مورد استفاده نیز ممکن است در برآورد مقدار LD مؤثر باشد (Ching et al., 2002). بر طبق نظر اسلاتکین (Slatkin, 1994)، نشانگرهای چند آلی (مانند ریزماهواره) جهت حصول یک LD معنی‌دار نسبت به نشانگرهای دو آلی (مانند SNP، DArT، ...) محتمل‌تر می‌باشند. رمینگتون و همکاران (Remington et al., 2001) نیز دامنه نسبتاً بالاتری از LD را بین نشانگرهای SSR نسبت به نشانگرهای SNP مشاهده کردند.

جدول ۴- نشانگرهای پیوسته با صفات ارزیابی شده در ژنوتیپ‌های برنج مورد مطالعه بر اساس مدل‌های GLM و MLM

Table 4. Linked markers to evaluated traits in the studied rice genotypes based on GLM and MLM models

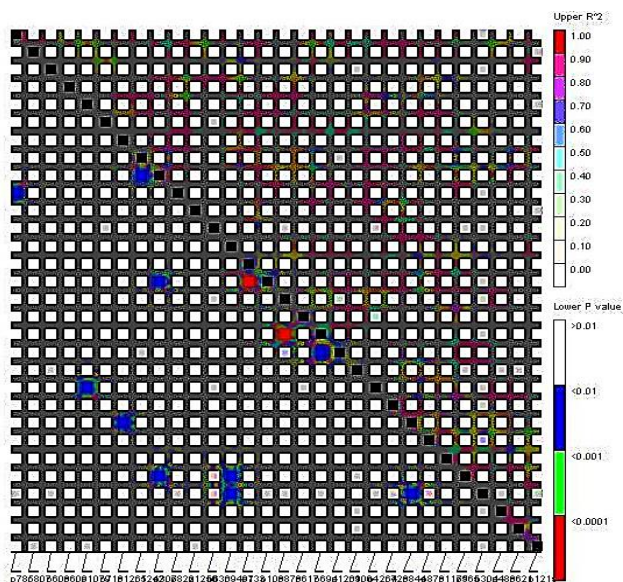
صفت Trait	نشانگر Marker	GLM model		MLM model	
		P-value	R ²	F-value	P-value
روز تا ۵۰ درصد گلدهی Days to 50% flowering	RM288	0.01	0.18	5.2	0.01
	RM3355	0.03	0.11	7.1	0.02
تعداد پنجه Number of tiller	RM201	0.02	0.19	4.6	0.01
	RM261	0.01	0.17	5.8	0.02
ارتفاع بوته Plant height	RM3355	0.01	0.11	3.3	0.04
	RM128	0.03	0.13	4.3	0.02
	RM311	0.06	0.10	5.4	0.01
طول خوشه Panicle length	RM3774	0.02	0.18	4.9	0.02
	RM593	0.01	0.21	5.4	0.01
طول برگ پرچم Flag leaf length	RM3248	0.02	0.14	5.3	0.03
	RM574	0.08	0.09	4.5	0.03
	RM5	0.01	0.17	5.1	0.02
عرض برگ پرچم Flag leaf width	RM16	0.03	0.11	3.9	0.02
	RM5	0.04	0.09	3.3	0.04
تعداد دانه پر Number of filled grain	RM6080	0.05	0.08	3.8	0.04
	RM214	0.03	0.13	4.6	0.02
تعداد دانه پوک Number of unfilled grain	RM256	0.03	0.12	2.4	0.04
	RM223	0.04	0.16	5.6	0.01
طول شلتوک Grain length	RM190	0.01	0.28	4.2	0.02
	RM574	0.03	0.12	3.6	0.04
	RM202	0.13	0.08	5.1	0.01
عرض شلتوک Grain width	RM201	0.01	0.09	4.4	0.02
	RM336	0.04	0.11	2.6	0.03
وزن صد دانه 100-grain weight	RM3330	0.01	0.19	4.1	0.03
	RM236	0.03	0.12	3.9	0.02
	RM223	0.10	0.09	3.3	0.04
	RM252	0.02	0.18	4.2	0.03
عملکرد دانه Grain yield	RM6080	0.01	0.23	4.7	0.03
	RM311	0.02	0.14	4.2	0.03
	RM128	0.04	0.09	3.6	0.04

مکان‌یابی ارتباطی با مدل‌های GLM و MLM

به‌منظور شناسایی نشانگرهای پیوسته با صفات مورد ارزیابی در ژنوتیپ‌های برنج مورد مطالعه، مکان‌یابی ارتباطی بر اساس مدل خطی عمومی (GLM) وابسته به ماتریس Q (ماتریس ضرایب احتمال عضویت هر فرد به هر یک از زیرجمعیت‌ها) و مدل خطی مخلوط (MLM) وابسته به ماتریس‌های Q+K (K: ماتریس روابط خویشاوندی) با استفاده از نرم‌افزار TASSEL 3.0 انجام گرفت. در کل بر اساس نتایج حاصل از مدل GLM، ۲۶ نشانگر ارتباط معنی‌داری با صفات مورد ارزیابی نشان دادند که از این تعداد، ۱۷ ارتباط در سطح احتمال پنج درصد و بقیه در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بودند. مکان‌های مرتبط و معنی‌دار بر اساس این مدل شامل ارتباط دو مکان با هر یک از صفات تعداد روز تا ۵۰ درصد گلدهی، تعداد پنجه، ارتفاع بوته، طول خوشه، طول و عرض برگ پرچم، تعداد دانه پر و پوک در خوشه و طول و عرض شلتوک و سه مکان با صفت وزن صد دانه و عملکرد دانه بود (جدول ۴). بر اساس مدل MLM که از اطلاعات بیشتری نسبت به مدل GLM و در نتیجه اریبی کمتر نتایج استفاده می‌کند، تعداد ۳۰ مکان معنی‌دار مرتبط با صفات مورد ارزیابی در سطوح احتمال پنج و یک درصد شناسایی شد که شامل ارتباط دو مکان با هر یک از صفات

روز تا ۵۰ درصد گلدهی، تعداد پنجه، طول خوشه، عرض برگ پرچم، تعداد دانه پر و پوک در خوشه و عرض شلتوک، سه مکان با صفات ارتفاع بوته، طول برگ پرچم، طول شلتوک و عملکرد دانه و چهار مکان با صفت وزن صد دانه بود (جدول ۴).

یو و باکلر (Yu and Buckler, 2006) به منظور بهبود نتایج و کاهش نتایج مثبت دروغین از مدل MLM در بررسی صفاتی مانند زمان گل‌دهی، وزن خوشه و قطر خوشه در ذرت استفاده و نتایج دقیق‌تری را در مقایسه با مدل‌های خطی منفرد K یا Q گزارش کردند. آگراما و همکاران (Agrama *et al.*, 2007) نیز با استفاده از روش مکان‌یابی ارتباطی، ارتباط بین ۱۲۳ نشانگر SSR را با صفات دانه در ۱۰۳ ژنوتیپ برنج بررسی کردند و ضمن تأیید اعتبار مدل MLM، ارتباط معنی‌دار ۵ مکان با صفات عملکرد دانه، عرض دانه و نسبت طول به عرض دانه، ۶ مکان با طول دانه و ۴ مکان با وزن هزار دانه را با استفاده از این مدل گزارش کردند. ون و همکاران (Wen *et al.*, 2009) نیز با استفاده از مدل MLM، نشانگرهای SSR مرتبط با صفات تاریخ خوشه‌دهی، ارتفاع گیاه و طول خوشه را روی کروموزوم شماره ۷ در یک ژرم‌پلاسما برنج چینی شناسایی و کارایی این روش را در شناسایی ارتباطات فنوتیپ - نشانگر تأیید کردند.



شکل ۳- پلات عدم تعادل لینکاژی. بالای قطر میزان عدم تعادل لینکاژی و پایین قطر P-value را برای جفت نشانگرها نشان می‌دهد.
Figure 3. Linkage disequilibrium plot (LD plot). Diameter upper and lower indicating linkage disequilibrium and p-value statistics for each pair of marker, respectively.

کارایی کاربرد این نشانگرها در برنامه‌های مختلف اصلاحی مانند گزینش به کمک نشانگر افزایش یابد. بدیهی است پس از آزمایش‌های تکمیلی و تأیید نتایج، از QTL‌های دارای R^2 بالا (RM190 و RM6080) می‌توان برای شناسایی ژن‌های رمزکننده صفات مورد نظر (به ترتیب طول شلتوک و عملکرد دانه)، استفاده و ناحیه ژنومی مربوطه را اشباع و توالی‌یابی کرد.

نتیجه‌گیری کلی

در این تحقیق، ارتباط بین ۲۵ نشانگر ریزماهوره با برخی از صفات مهم زراعی و مرفولوژیک در ۱۲۱ لاین و رقم برنج از طریق تجزیه ارتباطی ارزیابی شد. بر اساس نتایج، ساختار ژنتیکی جمعیت به پنج زیرجمعیت فرعی ($K=5$) تقسیم شد که نتایج حاصل از رسم بارپلات نیز آن‌را تایید کرد. نتایج تجزیه ارتباطی، ارتباط معنی‌دار بین ۲۶ و ۳۰ نشانگر را با صفات مورد مطالعه به ترتیب بر اساس روش‌های GLM و MLM نشان داد. وجود نشانگرهای مشترک برای برخی از صفات مانند ارتباط معنی‌دار نشانگر RM5 با صفات طول و عرض برگ پرچم و نشانگر RM3355 با صفات روز تا ۵۰ درصد گلدهی و ارتفاع بوته می‌تواند ناشی از آثار پلیوتروپی و یا پیوستگی نواحی ژنومی دخیل در این صفات باشد. همچنین، وجود ارتباط معنی‌دار چند نشانگر با یک صفت مانند ارتباط نشانگرهای RM3355، RM128 و RM311 با ارتفاع بوته، ماهیت کمی و چندژنی این صفات را نشان داد. نشانگرهای RM190 و RM6080 با ضریب تبیین بالا ارتباط معنی‌داری به ترتیب با صفات طول شلتوک و عملکرد دانه داشتند که می‌توانند پس از آزمایش‌های تکمیلی و تأیید نتایج، در برنامه‌های به‌نژادی آینده مورد استفاده قرار گیرند.

سپاسگزاری

از دانشکده علوم کشاورزی دانشگاه گیلان و مؤسسه تحقیقات برنج کشور به خاطر فراهم کردن امکانات لازم برای اجرای این تحقیق تشکر و قدردانی می‌شود.

تعدادی نشانگر مشترک نیز برای صفات مختلف با هر دو مدل خطی عمومی و خطی مخلوط در این تحقیق شناسایی شدند. به عنوان نمونه ارتباط و پیوستگی نشانگر RM5 با صفات طول و عرض برگ پرچم، نشانگر RM3355 با صفات روز تا ۵۰ درصد گلدهی و ارتفاع بوته، نشانگر RM201 با صفات تعداد پنجه و عرض شلتوک و نشانگر RM6080 با صفات تعداد دانه پر در خوشه و عملکرد دانه احتمالاً می‌تواند ناشی از آثار پلیوتروپی و یا پیوستگی نواحی ژنومی دخیل در کنترل این صفات باشد (Jun et al., 2008).

شناسایی نشانگرهای مشترک اهمیت زیادی در به‌نژادی گیاهان دارد، زیرا گزینش هم‌زمان چند صفت را امکان‌پذیر می‌سازند (Tuberosa et al., 2002). همچنین بر اساس نتایج ارائه شده در جدول ۴ می‌توان اظهار داشت که ارتباط چند نشانگر با یک صفت خاص (برای مثال ارتباط نشانگرهای RM3355، RM128 و RM311 با صفت ارتفاع بوته) حاکی از ماهیت توارث کمی و چندژنی صفات مورد ارزیابی می‌باشد. از طرفی کم بودن مقدار ضریب تبیین (R^2) برای اکثر نشانگرهای مرتبط نیز مؤید همین مطلب است و نشان دهنده توجیه بخش کمی از تغییرات این صفات از طریق مکان‌های ژنی شناسایی شده و بنابراین تأثیر بیشتر اثر محیط (نسبت به آثار ژنتیکی) روی تغییرات این صفات می‌باشد.

در کل با توجه به محدودیت‌های روش نقشه‌یابی پیوستگی از قبیل در دسترس نبودن جمعیت‌های در حال تفرق و زمان طولانی لازم جهت ایجاد آن‌ها، روش تجزیه ارتباطی با از بین بردن این محدودیت‌ها اطلاعات نشانگری مناسبی را در اختیار محققان قرار می‌دهد که نتایج مطالعه حاضر نیز کارایی استفاده از روش مکان‌یابی ارتباطی در شناسایی نشانگرهای مرتبط با صفات ارزیابی شده در ژنوتیپ‌های برنج مورد مطالعه را نشان داد. البته لازم است جهت اعتبارسنجی، نشانگرهای شناسایی شده و مرتبط با صفات مربوطه در جمعیت‌های بزرگ و با سطح بالاتری از تنوع و نیز در محیط‌های مختلف (تکرار در سال‌ها و مکان‌های مختلف) مورد بررسی قرار گیرند تا از ارتباط آن‌ها با صفات مربوطه اطمینان حاصل شود و به این ترتیب

References

Agrama, H. A., Eizenga, G. C. and Yan, W.

2007. Association mapping of yield and its

- components in rice cultivars. **Molecular Breeding** 19: 341-356.
- Allahgholipour, M., Mohammad Salehi, M. S. and Ebadi, A. A. 2004.** An evaluation of genetic diversity, and classification of rice varieties. **Iranian Journal of Agricultural Science** 35 (4): 973- 981. (In Persian with English Abstract).
- Al-Maskri, A. H., Sajjad, M. and Khan, S. H. 2012.** Association mapping: A step forward to discovering new alleles for crop improvement. **International Journal of Agriculture and Biology** 14: 153-160.
- Andersen, J. R., Zein, I., Wenzel, G., Krützfeldt, B., Eder, J., Ouzunova, M. and Lübberstedt, T. 2007.** High levels of linkage disequilibrium and associations with forage quality at a phenylalanine ammonia-lyase locus in European maize (*Zea mays* L.) inbreds. **Theoretical and Applied Genetics** 114: 307-319.
- Anderson, J. A., Churchill, G. A., Autrique, J. E. and Tanksley, S. D. 1993.** Optimizing parental selection for genetic linkage maps. **Genome** 36: 181-186.
- Breseghele, F. and Sorrells, M. E. 2006.** Association mapping of kernel size and milling quality in wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars. **Genetics** 172: 1165-1177.
- Ching, A., Caldwell, K. S., Jung, M., Dolan, M., Smith, O. S., Tingey, S., Morgante, M. and Rafalski, A. J. 2002.** SNP frequency, haplotype structure and linkage disequilibrium in elite maize inbred lines. **BMC Genetics** 3: 19.
- Das, B., Sengupta, S., Parida, S. K., Roy, B., Gosh, M., Prasad, M. and Ghose, T. K. 2013.** Genetic diversity and population structure of rice landraces from Eastern and North Eastern States of India. **BMC Genetics** 14: 71.
- DeWan, A., Liu, M., Hartman, S. and Zhang, S. S. M. 2006.** *HTRA1* promoter polymorphism in wet age-related macular degeneration. **Science** 314 (5801): 989-992.
- Doerge, R. W. 2002.** Mapping and analysis of quantitative trait loci in experimental populations. **Nature Reviews Genetics** 3 (1): 43-52.
- Evanno, G., Regnaut, S. and Goudet, J. 2005.** Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: A simulation study. **Molecular Ecology** 14 (8): 2611-2620.
- FAO. 2013.** Food and agriculture organization of the United States. Available online at: <http://faostat.fao.org/>.
- Gupta, P. K., Rustgi, S. and Kulwal, P. L. 2005.** Linkage disequilibrium and association studies in higher plants: Present status and future prospects. **Plant Molecular Biology** 57: 461-485.
- IRRI. 2002.** Standard evaluation system for rice. International Rice Research Institute, Manila, Philippines.
- Jia, L. M., Yan W. G., Zhu, C. S., Agrama, H. A., Jackson, A., Yeater, K., Li, X. B., Huang, B. H., Hu, B. L., McClung, A. and Wu, D. X. 2012.** Allelic analysis of sheath blight resistance with association mapping in rice. **PLoS One** 7: e32703.
- Jin, L., Lu, Y., Xiao, P., Sun, M., Corke, H. and Bao, J. S. 2010.** Genetic diversity and population structure of a diverse set of rice germplasm for association mapping. **Theoretical and Applied Genetics** 121: 475-487.
- Jun, T. H., Van, K., Kim, M. Y., Lee, S. H. and Walker, D. R. 2008.** Association analysis using SSR markers to find QTL for seed protein content in soybean. **Euphytica** 62: 179-191.
- Kiani, Gh. and Nematzadeh, Gh. 2012.** Assessment of genetic variability of rice fertility restorer lines based on morphological traits. **Journal of Research and Development** 97: 122-130. (In Persian with English Abstract).
- Kovi, M. R., Hu, Y., Bai, X. and Xiang, Y. 2015.** QTL mapping for thermo-sensitive heading date in rice. **Euphytica** 205: 51-62.
- Liu, L., Wang, L., Yao, J., Zheng, Y. and Zhao, C. 2010.** Association mapping of six agronomic traits on chromosome 4A of Wheat (*Triticum aestivum* L.). **Molecular Plant Breeding** 1 (5): 1-10.
- Maccaferri, M., Sanguineti, M. C., Demontis, A. and El-Ahmed, A. 2010.** Association mapping in durum wheat grown across a broad range of water regimes. **Journal of Experimental Botany** 14: 287-293.
- Mackay, T. F., Stone, E. A. and Ayroles, J. F. 2009.** The genetics of quantitative traits: Challenges and prospects. **Nature Reviews Genetics** 10 (8): 565-577.
- Mardani, Z., Rabiei, B., Sabouri, H. and Sabouri, A. 2013.** Mapping of QTLs for Germination Characteristics under Non-stress and Drought Stress in Rice. **Rice Science** 20 (6): 391-399.
- Mauricio, R. 2001.** Mapping quantitative trait loci in plants: Uses and caveats for

- evolutionary biology. **Nature Reviews Genetics** 2 (5): 370-381.
- Mokrani, L., Gentzbittel, L., Azanza, F., Fitamant, L., Al-Chaarani, G. and Sarrafi, A. 2002.** Mapping and analysis of quantitative trait loci for grain oil content and agronomic traits using AFLP and SSR in sunflower (*Helianthus annuus* L.). **Theoretical and Applied Genetics** 106 (1): 149-156.
- Pasam, R. K., Sharma, R., Malosetti, M. and Van Eeuwijk, F. A. 2012.** Genome-wide association studies for agronomical traits in a world wide spring barley collection. **BMC Plant Biology** 12 (1): 16.
- Pritchard, J. K. and Donnelly, P. 2001.** Case-control studies of association in structured or admixed populations. **Theoretical Population Biology** 60: 227-237.
- Pritchard, J. K., Stephens, M. and Donnelly, P. 2000.** Inference of population structure using multilocus genotype data. **Genetics** 155 (2): 945-959.
- Rahimi, M., Rabiei, B., Ramezani, M. and Movafegh, S. 2010.** Evaluation of agronomical traits and variables determination for yield improvement of rice. **Iranian Journal of Field Crops Research** 8 (1): 111-119. (In Persian with English Abstract).
- Remington, D. L., Thornsberry, J. M., Matsuoka, Y., Wilson, L. M., Whitt, S. R., Doebley, J., Kresovich, S., Goodman, M. M. and Buckler, E. S. 2001.** Structure of linkage disequilibrium and phenotypic associations in the maize genome. **PNAS** 98: 11479-11484.
- Rogers, S. O. and Bendich, A. J. 1985.** Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified plant tissues. **Plant Molecular Biology** 5 (2): 69-76.
- Sabouri, A., Rabiei, B., Toorchi, M., Aharizad, S. and Moumeni, A. 2012.** Mapping quantitative trait loci (QTL) associated with cooking quality in rice (*Oryza sativa* L.). **Australian Journal of Crop Science** 6 (5): 808-814.
- Semagn, K., Bjørnstad, A. and Xu, Y. 2010.** The genetic dissection of quantitative traits in crops. **Electronic Journal of Biotechnology** 13 (5): 1-45.
- Slatkin, M. 1994.** An exact test for neutrality based on the Ewens sampling distribution. **Genetic Research** 64: 71-74.
- Spataro, G., Tiranti, B., Arcaleni, P. and Bellucci, E. 2011.** Genetic diversity and structure of a worldwide collection of *Phaseolus coccineus* L. **Theoretical and Applied Genetics** 122 (7): 1281-1291.
- Tripathi, K. K., Govila, O. P., Warreir, R. and Ahuja, V. 2011.** Biology of *Oryza sativa* L. (Rice). Ministry of Environment and Forests Government of India. Department of Biotechnology, Ministry of Science and Technology Government of India. pp: 1-63.
- Tuberosa, R., Gill, B. S. and Quarrie, S. A. 2002.** Cereal genomics: Ushering in a brave new world. **Plant Molecular Biology** 48 (5): 445-449.
- Vanniarajan, C., Vinod, K. K. and Pereira, A. 2012.** Molecular evaluation of genetic diversity and association studies in rice (*Oryza sativa* L.). **Genetics** 91: 1-11
- Wen, W., Mei, H., Feng, F., Yu, S., Huang, Z., Wu, J., Chen, L., Xu, X. and Luo, L. 2009.** Population structure and association mapping on chromosome 7 using a diverse panel of Chinese germplasm of rice (*Oryza sativa* L.). **Theoretical and Applied Genetics** 119: 459-470.
- Yu, J. and Buckler, E. S. 2006.** Genetic association mapping and genome organization of maize. **Current Opinion in Biotechnology** 17 (2): 155-160.
- Yu, J. M., Pressoir, G., Briggs, W. H. and Bi, I. V. 2006.** A unified mixed-model method for association mapping that accounts for multiple levels of relatedness. **Natural Genetics** 38: 203-208.
- Zheng, H., Wang, J., Zhao, H., Liu, H., Sun, J., Guo, L. and Zou, D. 2015.** Genetic structure, linkage disequilibrium and association mapping of salt tolerance in japonica rice germplasm at the seedling stage. **Molecular Breeding** 35: 152. <https://doi.org/10.1007/s11032-015-0342-1>.
- Zhu, J., Gale, M. D., Quarrie, S., Jackson, M. T. and Bryan, G. J. 1998.** AFLP markers for the study of rice biodiversity. **Theoretical and Applied Genetics** 96: 602-611.
- Zietkiewicz, E., Rafalski, A. and Labuda, D. 1994.** Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. **Genomics** 20 (2): 176-183



University of Guilan
Faculty of Agricultural
Sciences

Cereal Research
Vol. 7, No. 1, Spring 2017 (1-16)

Association and structure analysis of some of rice (*Oryza sativa* L.) genetic resources based on microsatellite markers

Heydar Azizi¹, Ali Aalami^{2*}, Masoud Esfahani³ and Ali Akbar Ebadi⁴

Received: June 23, 2015

Accepted: November 7, 2015

Abstract

The economic value of cultivar depends on different characteristics. Thus detailed knowledge on genetic behavior and identification of genomic loci involved in control of these traits could help to breeder to improve plant cultivars. In this investigation, relation and linkage among 25 microsatellite markers with some of important agromorphological traits in 121 different rice cultivars and lines were evaluated based on GLM and MLM association models using the Structure and Tassel software. Based on the 25 microsatellite markers used in this study, population genetic structure divided into five subpopulations (K=5) that barplot results also confirmed it. In association analysis based on GLM and MLM models, 26 and 30 loci showed significant relations with the evaluated traits, respectively, and confirmed considerable variations of this studied traits. In the present study, identified common markers between of some of assayed traits such as significant relation of RM5 marker with flag leaf length and width traits and RM3355 with days to 50% flowering and plant height traits can be due to pleiotropic effects or linkage between of genomic regions involved in these traits. Also RM190 and RM6080 markers with higher R^2 were related to paddy length and grain yield, respectively, that these related region could be saturated and sequenced after complementary experiments and confirmation for identification of coding genes of these traits.

Keywords: Linkage disequilibrium, Pleiotropic, Population genetic structure

1. Ph. D. Graduated, Dept. of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran (Current address: Research Assist. Prof., Dept. of Sugar Beet Research, West Azarbaijan Agricultural and Natural Resources Research Center, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Urmia, Iran)
2. Assist. Prof., Dept. of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran
3. Prof., Dept. of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran
4. Research Assist. Prof., Dept. of Seed Improvement, Rice Research Institute of Iran, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Rasht, Iran

* Corresponding author: ali_aalami@guilan.ac.ir