Downloaded from jcb.sanru.ac.ir at 2:10 +0430 on Monday May 27th 2019

بررسي تنوع ژنتيكي با استفاده از نشانگرهاي مولكولي پيوسته براي ميزان آميلوز در ميان برخي ارقام برنج ايراني

م. ر. راحمي[۱]، س. ك. كاظمي تبار[۲]، ع. مومني[۳]، ع. ا. عبادي[۴] و ن. فرهادي[۵]

چكيده

نشانگرهاي مولكولي بهترين روش براي بررسي تنوع ژنتيكي مي‌باشند. در اين آزمايش، ۷۲ رقم كه شامل گونه هاي *Indica* و *Japonica* بودند در مركز تحقيقات برنج كشور مورد بررسي قرار گرفتند. براي اجراي آزمايش تنوع ژنتيكي مكان ژن *waxy* پيوسته با صفت كنترل كننده ميزان آميلوز واكنش PCR با استفاده از دو اليگونكلوتيد (۴۸۴ و ۴۸۵) بخوبي انجام و امتيازدهي مربوطه صورت گرفت. ارقام برنج ايراني با استفاده از نشانگر ريزماهواره *waxy* غربال شده و براساس ميزان تكرار توالي $(CT)_n$ به هفت گروه از تعداد n از هفت تا بيست تقسيم شدند. ميزان تغييرات طول باند محصول PCR بدست آمده از ۱۰۲ تا ۱۲۸ جفت باز متغير بود و تعداد توالي $(CT)_n$ براي n برابر با ۷، ۸، ۱۴، ۱۷، ۱۸، ۱۹ و ۲۰ را نشان داد كه مطابق با ميزان آميلوز ارقام ژرم پلاسم ايراني بدست آمده در هفت گروه در اين مكان ژني به ترتيب ۷۰، ۷۲، ۷۸/۹۵، ۸۰ و ۷۰ درصد از تغييرات هر گروه را توجيه مي‌كردند.

واژه هاي كليدي: برنج، ريزماهواره *Waxy*، اليگونوكلوتيد، ميزان آميلوز

۱- كارشناس علوم و فنون هسته‌اي- مركز فناوري هسته سازمان انرژي اتمي ايران

۲- استاديار دانشگاه علوم كشاورزي و منابع طبيعي ساري

۳- استاديار مركز تحقيقات برنج كشور- رشت

۴- مربي پژوهشي مركز تحقيقات برنج كشور- رشت

۵- كارشناس سازمان استاندارد و تحقيقات صنعتي ايران

Downloaded from jcb.sanru.ac.ir at 2:10 +0430 on Monday May 27th 2019

مقدمه

برنج (*Oryza sativa* L.) يكي از محصولات غذايي مهم در دنياست و ماده غذايي ضروري مصرفي بيش از نصف مردم دنياست. برنج منبع غذايي بسيار مهم براي مردم كشورهاي جهان سوم است. ميزان آميلوز بعنوان فاكتور مهمي در تعيين كيفيت پخت برنج شناسايي شده است. ميزان تلاش و تحقيق اصلاحگران در ارتقا دادن كيفيت برنج مانند بهبود عملكرد برنج مورد توجه آنها بوده است. در ارقام برنج ميزان آميلوز به صورت پايين، متوسط و بالا نشان داده مي‌شود (۶ و ۷). اغلب مطالعات در اين زمينه نشان مي دهد كه اين صفت بوسيله مكان ژني *waxy* روي بازوي كوتاه كروموزوم شماره ۶ قرار دارد (۱۱). براي نشان دادن اين استدلال و تجزيه ژنتيكي آن از نشانگرهاي ريزماهواره اي استفاده شده است.

بلايت و همكارانش (۴) يك تنوع ريزماهواره‌اي با ۴ آلل مختلف در ژن *waxy* (واقع در ۵۵ bp بالاتر از اينترون 5-Leader كه كاملا پيوسته با مكان ژني *waxy* بود.) در ۱۳ رقم برنج تجاري گزارش شد و ارتباط بين كلاس‌هاي ريزماهواره با مقادير مختلف آميلوز با استفاده از اليگونكلئوتيدهاي ۴۸۴ و ۴۸۵ با توالي ۲۰ و ۲۱ نوكلئوتيدي (CTTTGTCTATCTCAAGACAC) و (TTGCAGATGTTCTTCCTGATG) مورد ارزيابي قرار دادند و بيان نمودند كه اين نشانگر شاخص خوبي براي تعيين دامنه ميزان آميلوز (نشاسته) در بين ارقام برنج تجاري و در حال اصلاح مي‌باشد. ايرس و همكارانش (۱) تنوع ريزماهواره‌اي را در ۸۹ رقم برنج و ۱۰۱ نتاج حاصل از تلاقي دو رقم با مقادير متوسط و پايين آميلوز مورد ارزيابي قرار داده‌اند آنها گزارش كرده‌اند كه ۸ آلل ريزماهواره‌اي مي‌توانند ۸۲/۹% از تنوع مربوط به مقدار آميلوز را در ۸۹ رقم و ۱۰۱ نتاج حاصل توجيه كنند. همچنين طول باندهاي مختلف ريزماهواره را بين ۱۳۰-۱۲۷$_{bp}$ و توالي تكراري $(CT)_n$ را (n =۸ تا n =۲۰) [۲۰، ۱۹، ۱۸، ۱۷، ۱۶، ۱۴، ۱۱ و ۸] گزارش كرده‌اند. بدين ترتيب توالي‌هاي $(CT)_{19}$ و $(CT)_{18}$ $(CT)_{17}$ داراي مقادير پايين آميلوز (۱۷%-۱۴) و ارقام داراي توالي‌هاي $(CT)_{14}$ و $(CT)_{8}$ و $(CT)_{20}$ داراي مقادير متوسط (۲۲%-۲۱) و ارقام با توالي $(CT)_{11}$ داراي مقادير بالاتر آميلوز (۲۵%) هستند و يكي از ارقام بدون آميلوز داراي توالي $(CT)_{12}$ است. اين مكان ريزماهواره اي ۸۸% از تغييرات ميزان آميلوز در ۱۹۸ واريته و ارقام اصلاح شده آمريكايي را نشان داد (۳).

ايرس و همكاران (۱) و شو و همكارانش (۱۰) ۸ آلل ريزماهواره‌اي در مكان ژني *waxy* كه با همديگر ۸۲/۹% از تنوع مربوط به مقدار آميلوز موجود را در ارقام غير *waxy* برنج را نشان مي‌داد گزارش كردند. پس اين ريزماهواره مي‌تواند به عنوان يك نشانگر مولكولي براي اصلاحگران برنج مورد استفاده قرار گيرد تا روند كارهاي اصلاحي براي دست‌يابي به ارقامي با ميزان آميلوز مطلوب با سرعت بيشتري صورت گيرد.

پرتفا (۹) با آزمايش روي ۶۸ رقم متعلق به دو گونه *Oryza* براي بررسي ناحيه ريزماهواره *Wx* روي توالي تكراري $(CT)_n$ كه كاملا پيوسته با ژن *Waxy* برنج (با آميلوز بالا، متوسط و

Downloaded from jcb.sanru.ac.ir at 2:10 +0430 on Monday May 27th 2019

پايين) بود که قطعات DNA سنتز شده در ابتداي اگزون ۱ و اينترون ۱ از ژن *Waxy* قرار دارند، ۱۰ دسته ريزماهواره شناسايي کرد که چند شکلي ميان ارقام برنج با آميلوز بالا و متوسط و پايين را نشان دادند.

بائو و همکاران (۲) در آزمايشي روي ۵۲ رقم برنج ۴ آلل ريزماهواره در توالي تکراري $(CT)_n$ شامل n برابر با ۱۶، ۱۷، ۱۸ و ۱۹ در مکان ژن *Waxy* در برنج‌هاي *Waxy* مشاهده نمودند، که $(CT)_{17}$ بيشترين فراواني را در بين اين ارقام داشت. تمنيخ و همکاران (۱۲) ۱۸۸ گزارش نمود که در مکان ژني OSR19 ۷ آلل روي ۵۳۲ رقم مشاهده کرده است. تيان و همکاران (۱۳) صفات ميزان آميلوز، درجه ژلاتينه شدن، ميزان جذب آب و افزايش طول برنج پخته شده را در ارقام دابل هاپلوئيد را مورد بررسي قرار دادند و مشخص کردند که براي اين صفات بيشترين سهم مکاني روي بازوي کوتاه کروموزوم شماره ۶ با مرکزيت آغازگر RM190 قرار دارد.

نتايج محققين در ترکيب با گزارشات پيشين بيشتر روي اين مساله تاکيد مي‌کند که ژن *Waxy* يا يک منطقه ژني کاملا پيوسته با آن نقش مهمي را در تعيين کيفيت پخت برنج بازي مي‌کند. در آزمايشات صورت گرفته ميزان آميلوز توسط يک مکان ژني ساده اثر بزرگي در ميزان آميلوز پايين، متوسط و بالا دارد. هدف اصلي از اين مطالعه بررسي تنوع در مکان ژني *Waxy* با استفاده از نشانگرهاي مولکولي در ارقام برنج بومي ايران مي‌باشد.

مواد و روش‌ها

ارقام برنج مورد استفاده در اين مطالعه که مجموعاً ۷۲ رقم مي‌باشد در جدول ۱ آورده شده است. تمامي نمونه‌ها در اواخر فروردين ماه کاشته شده و در اواخر مرداد ماه برداشت شده‌اند.

با استفاده از روش CTAB، DNA برگ‌هاي تازه برنج استخراج شد (۵) و پس از آن کيفيت و کميت DNA استخراج شده با استفاده از روش اسپکتروفتومتر و ژل آگارز مشخص شد. ميزان آميلوز براساس روش juliano (۸) با استفاده از روش اسپکتروفتومتر اندازه‌گيري شد. پرايمر مورد استفاده براي افزايش تعداد ريزماهواره در بازوي کوتاه کروموزوم شماره ۶ قرار داشت که با اليگو نوکلوتيد هاي ۴۸۴ و ۴۸۵ مشخص شد. براي ارزيابي ريزماهواره، واکنش‌هاي زنجيره‌اي پليمراز محتوي ۱۰ ميکروليتر بود که از اين مقدار ۲ ميکروگرم آن DNA برنج، ۰/۵ ميکرو ليتر آن هر يک از جفت پرايمرها، ۰/۴۸ ميکروليتر کلريد منيزيم، ۱/۲ ميکروليتر dNTPs، ۱ ميکروليتر بافر PCR و ۰/۱۳ واحد آنزيم تک پليمراز بود. واکنش زنجيره‌اي پليمراز طي ۲۴ چرخه در دماهاي ۹۵ °C به مدت ۴۵ ثانيه، ۵۵ °C به مدت ۴۵ ثانيه و ۷۲ °C به مدت ۳۰ ثانيه صورت مي گرفت و در نهايت در دماي ۷۲ °C به مدت ۵ دقيقه خاتمه مي‌يافت. رنگ فرم آميد به محصول واکنش زنجيره‌اي پليمراز که در دماي ۹۵ °C به مدت ۵ دقيقه واسرشت شده و به سرعت روي يخ سرد شده

Downloaded from jcb.sanru.ac.ir at 2:10 +0430 on Monday May 27th 2019

است اضافه شد، سپس 5 ۶ ميکروليتر از نمونه از روي ژل اکريل آميد ۶% به مدت ۱ ساعت با توان ۱۰۰ وات با استفاده از توالي ژل بيوراد عبور داده شد. محصول واکنش زنجيره‌اي پليمراز به واسطه ايجاد لکه‌هاي نقره‌اي رنگ و با امتيازبندي اين لکه‌ها مشخص شد.

جدول ۱- ليست ارقام برنج و اندازه توالي تکراري CT براي مکان ژني *Waxy*

رديف	رقم	$(CT)_n$	ميزان آميلوز (%)
۱	قصرالدشت	۸	۲۱/۳
۲	طارم اميري	۱۹	۲۳/۶۹
۳	غريب	۱۴	۲۳/۸۹
۴	شاه‌پسند	۱۸	۲۴/۱۴
۵	حسن‌سرايي	۱۴	۲۳/۳۹
۶	زيربندي	۱۷	۲۳/۲۶
۷	سالاري	۸	۲۱
۸	رشتي	۸	۲۱/۹۶
۹	صدري	۷	۲۰/۴
۱۰	آبجي بوجي	۸	۲۰/۰۲
۱۱	قشنگه	۸	۱۲/۴۷
۱۲	محمدي چپرسر	۸	۲۷/۷۶
۱۳	موسي طارم	۱۷	۱۹/۸۳
۱۴	رشتي سرد	۸	۲۱/۹۶
۱۵	اهلمي طارم	۸	۲۲
۱۶	دشت	۸	۲۲/۴
۱۷	دمسياه	۸	۲۲/۳
۱۸	طارم محلي	۸	۲۲
۱۹	عنبربو	۱۴	۲۰/۳
۲۰	سنگ طارم	۱۴	۲۴/۹
۲۱	سنگ جو	۱۴	۲۴/۰۱
۲۲	حسني	۱۴	۲۲/۵۴
۲۳	طارم منطقه	۱۸	۲۲/۲۶
۲۴	حسن‌سرايي آتشگاه	۸	۲۲/۳۳
۲۵	حسن‌سرايي غلات پيچيده	۸	۲۱/۰۵
۲۶	زيره	۸	۲۵/۳۳
۲۷	مير طارم	۸	۲۲/۶
۲۸	علي کاظمي	۸	۲۰/۸۴
۲۹	دادرس	۱۴	۲۰/۶۲
۳۰	محمدي چپرسر	۱۴	۲۳
۳۱	سرخه	۱۸	۲۴/۹۱
۳۲	هاشمي	۱۸	۲۴/۷۹
۳۳	چمپا بودار	۸	۲۴/۵۶

Downloaded from jcb.sanru.ac.ir at 2:10 +0430 on Monday May 27th 2019

ادامه جدول ۱- لیست ارقام برنج و اندازه توالی تکراری CT برای مکان ژنی *Waxy*

ردیف	رقم	$(CT)_n$	میزان آمیلوز (%)
۳۴	فارسي ۱	۲۰	۲۵/۷۹
۳۵	دم‌سرٮا	۸	۱۷/۳۱
۳۶	طارم دشتورورگهان	۱۸	۲۳/۲۹
۳۷	میانه	۸	۲۰/۸۶
۳۸	دمسیاه	۱۸	۲۶/۳
۳۹	زاینده رود	۱۴	۱۸/۵۲
۴۰	پاŞ غریب دمدار	۱۴	۲۳/۷۸
۴۱	بینام	۱۴	۲۱/۲۶
۴۲	یکي	۸	۱۷/۳۳
۴۳	مرجو	۱۴	۱۵/۲۵
۴۴	شاهي	۱۴	۱۵/۱۹
۴۵	شصتG ملکي	۸	۲۰/۸۶
۴۶	علم سبز	۱۸	۲۳/۸۷
۴۷	حسني رزاوانشهر	۱۴	۲۴/۶۱
۴۸	گلي	۲۰	۲۱/۰۷
۴۹	ساري šلتیG	۱۴	۲۰/۱
۵۰	دیلماني	۱۴	۲۴/۵
۵۱	درودزن فارسي	۸	۲۰/۸۷
۵۲	بژي	۱۷	۱۵/۴۹
۵۳	سفید	۱۸	۱۲/۵۳
۵۴	غریب دمدار	۱۸	۲۳/۲۱
۵۵	گرم صدري	۱۸	۲۴/۹۲
۵۶	šمڤا بودار	۸	۲۲/۲۵
۵۷	صدري دمسیاه	۸	۱۸/۳۶
۵۸	صدري دور	۱۷	۱۸/۵۵
۵۹	شلتوك šمڤا سر Ʊون	۱۷	۱۶/۳۰
۶۰	رزااجو	۷	۱۴/۵۸
۶۱	صدري دم‌سرٮا	۷	۱۲/۳
۶۲	نگوران	۷	۱۳/۷۲
۶۳	گرده لرستان	۱۴	۱۱/۹۶
۶۴	طارم دمسیاه	۸	۲۰
۶۵	فارسي ۲	۷	۱۰/۵۱
۶۶	برنج šمڤادوپلون	۷	۱۳/۹۷
۶۷	فارسي ۴	۷	۲۲/۹۵
۶۸	صدري دم‌سفید	۱۴	۲۰/۳۷
۶۹	میرطارم	۷	۱۳/۲۳
۷۰	سنگري	۷	۱۲/۰۲
۷۱	عنبربو ایلام	۱۴	۲۲/۹۴
۷۲	صدري موëیي	۷	۲۰/۴۷

Downloaded from jcb.sanru.ac.ir at 2:10 +0430 on Monday May 27th 2019

نتايج و بحث

۷۲ واريته برنج از نقطه نظر مهمترين ژرم‌پلاسم‌هاي ايراني با استفاده از ماركرهايي كه در مجاورت ريز ماهواره‌هاي ژن واكسي بودند ارزيابي شدند. كليه واكنش‌هاي زنجيره‌اي پليمراز به درستي انجام و باندهاي حاصله به دقت امتيازبندي شد. ميزان آميلوز هر واريته در اين مطالعه مشخص شد. براساس تحقيقات مؤسسه بين المللي تحقيقات برنج، ارقام برنج غير ژلاتيني داراي ميزان آميلوز (۲%-۱)، در ارقامي كه ميزان ژلاتين پايين بود، ميزان آميلوز (۲۰%-۱۰)، در ارقامي با ميزان ژلاتين متوسط ميزان آميلوز (۲۵%-۲۰) و در ارقامي با ميزان ژلاتين بالا، ميزان آميلوز (۳۰%-۲۵) بود (آ و ۷). در اين تحقيق، ميزان آميلوز با استفاده از واكنش زنجيره‌اي پليمراز به دست آمده است. براساس اطلاعات به دست آمده از تحقيق حاضر، ۷ دسته از ريز ماهواره‌هاي واكسي كه شامل تكرار هاي $(CT)_n$، (به ترتيب از n=۷ تا n=۲۰) بودند مشخص شد. بر اين اساس، واريته هايي كه در اين ۷ دسته قرار گرفتند، اغلب در ۴ گروه طبقه‌بندي شدند. محصولات واكنش زنجيره‌اي پليمراز در فاصله باندي (bps ۱۲۸-۱۰۲) قرار گرفتند و تكرارهاي $(CT)_n$ كه شامل $(CT)_7$، $(CT)_8$، $(CT)_{14}$، $(CT)_{17}$، $(CT)_{18}$، $(CT)_{19}$ و $(CT)_{20}$ به دست آمد. به اين ترتيب، ژرم‌پلاسم‌هاي ارقام ايراني از نظر جايگاه ژني در ۷ دسته طبقه‌بندي شدند. فراواني آلل‌ها در نمونه‌هايي از ارقام برنج كه غير واكسي بودند به قرار زير است. ۱۰ رقم برنج داراي آلل $(CT)_7$ بودند كه ۷۰% از اين واريته‌ها در گروه واريته‌هايي با آميلوز پايين (رو به پايين) قرار گرفتند. ۲۵ رقم برنج داراي $(CT)_8$ بودند و ۷۲% از اين ارقام در گروه واريته هايي با آميلوز متوسط رو به پايين قرار گرفتند. ۱۹ رقم برنج داراري آلل $(CT)_{14}$ بودند كه ۷۸/۹۵% از اين ارقام در گروه واريته هايي با آميلوز متوسط قرار گرفتند. ۵ واريته داراي آلل $(CT)_{17}$ بودند و ۸۰% از اين ارقام در گروه واريته هايي با آميلوز پايين رو به بالا قرار گرفتند. ۱۰ رقم برنج داراي آلل $(CT)_{18}$ بودند كه ۷۰% از اين ارقام در گروه واريته هايي با آميلوز متوسط رو به بالا قرار گرفتند. ارقام باقيمانده نيز داراي آلل هاي $(CT)_{19}$ و $(CT)_{20}$ بودند.

تكرار هاي $(CT)_4$، $(CT)_7$، $(CT)_9$، $(CT)_{10}$، $(CT)_{11}$، $(CT)_{12}$ و $(CT)_{13}$ در ژرم پلاسم‌هاي ايراني مشاهده نشد اين در حالي است كه اين تكرارها در ارقام برنج ايالات متحده آمريكا (۱ و ۴) مشاهده و گزارش شد. همچنين ۷ آلل مذكور در ژرم پلاسم هاي ارقام برنج تايلندي (۹) نيز گزارش شد. دسته $(CT)_8$ به طور چشمگيري در خزانه ژني ارقام ايراني موجود بود و ۲۵ رقم از ارقام مورد آزمايش در اين دسته قرار گرفتند.

دسته $(CT)_{18}$ تنها در ارقام برنج ژلاتيني بومي (ارقام برنج تحت كشت و ارقام وحشي) مشاهده شد. در مقابل كليه ارقام غير ژلاتيني در برنج با ميزان آميلوز بالا (بيشتر از ۲۵%) در دسته $(CT)_{11}$ قرار گرفتند. در اين راستا نتايج مشابهي در نمونه هاي برنج ايالات متحده آمريكا نيز گزارش شد (۱).

اين ارقام به واسطه قرار گرفتن در دسته هاي $(CT)_n$ از يكديگر متمايز شدند.

Downloaded from jcb.sanru.ac.ir at 2:10 +0430 on Monday May 27th 2019

بنابراين در ارقام برنج تايلندي دسته هاي ريز ماهواره هاي *WX* كه داراي پلي مورفيسم هستند سبب شد كه اغلب نژاد هاي برنج در دسته هايي با آميلوز متفاوت قرار گرفته و از يكديگر متمايز گردند. اين ريز ماهواره ها كه لينكاژ زيادي با ژن واكسي دارند از پتانسيل مناسبي جهت استفاده در برنامه هاي اصلاحي برخوردارند. اصلاح كنندگان برنج نيز از اين پتانسيل براي رديابي ژنهاي واكسي از لاين هاي منتخب، بدون ارزيابي كيفيت دانه حاصل از تلاقي دو واريته استفاده مي كنند. با اين همه، دلايل احتمالي در بروز تفاوت هاي ريز ماهواره هاي واكسي در ميان ارقام برنج ژنتيكي حاكي از اين امر مي باشد كه نمونه برداري به ميزان لازم صورت نگرفته است همچنين، شجره ارقام برنج در اين مطالعه مشخص نشده است. با اين همه، تفاوت ها، نشاندهنده تمايز حقيقي ميان ژنوم برنج هايي كه توسط افراد و كشاورزان ايراني بومي شده اند، است. همچنين ارقام مورد استفاده در اين تحقيق تفاوتي را در فراواني توزيع ريز ماهواره هاي واكسي در نواحي مختلف نشان دادند. ارقام برنج بومي و مطالعات تكاملي تدريجي، اطلاعات ارزشمندي را درباره تفاوت ژنتيكي فراهم مي كنند. ارقام برنج بومي ايران از نظر مطالعات مولكولي بايستي بيشتر مورد بررسي قرار بگيرند. بنابراين بررسيهاي همه جانبه ژرم پلاسم هاي ارقام برنج بومي ايراني از نظر تفاوت در ريز ماهواره هاي واكسي كارا مي باشند. مطالعاتي كه در گذشته انجام شده نشان داد كه ۷ آلل ريز ماهواره $(CT)_n$ در ۵۵-bp بالاي جهت سر '۵ فرزاي جايگاه اتصال انترون ها به هم در ژن هاي واكسي قرار دارد (۱، ۲، ۴ و ۱۰). اين آلل ها مي توانند درصد بالايي از تفاوت در ميزان آميلوز در برنج را بيان كنند (۱، ۲، ۳ و ۱۰). براساس تحقيقاتي كه روي ژرم پلاسم هاي ارقام برنج ايالات متحده و تايلند صورت گرفته در هيچ تحقيقي دسته $(CT)_۷$ گزارش نشده است. نتايج حاصل از اين تحقيق نشان داد كه در ميان ارقام تنها در رقم دمسياه ميزان آميلوز متوسط نسبت به ميزان آميلوز پايين و بالا، بيشتر مشاهده شد.

تشكر و قدرداني

تشكر و سپاس از خانمها فرهادي، كاتوزي و نويريان و آقاي توسلي و مركز تحقيقات برنج ايران كه صميمانه مواد آزمايشگاهي را در اختيار اينجانب قرار دادند.

Downloaded from jcb.sanru.ac.ir at 2:10 +0430 on Monday May 27th 2019

منابع

1. Ayres, N.M., A.M. McClung, P.D. Larkin, H.F.J. Bligh, C.A. Jones and W.D. Park. 1997. Microsatellites and single-nucleotide polymorphism differentiate apparent amylose classes in an extended pedigree of US rice germ plasm. Theoretical Applied Genetics. 94: 773-781.
2. Bao, J.S., H. Corke and M. Sun. 2002. Microsatellite in starch-synthesizing genes in relation to starch physicochemememical properties in *waxy* rice (*Oryza Sativa L.*). Theor Appl Genet. 105: 898-905.
3. Bergman C.J., J.T. Delgado, A.M. McClung and R.G. Fjellstrom. 2001. An improved method for using a microsatellite in the rice *waxy* gene to determine amylose class. Cereal Chem 78: 257-260.
4. Bligh, H. F., J.R.I. Till and C.A. Jones. 1995. A microsatellite sequence closely linked to the *waxy* gene of (*Oryza Sativa).* Euphytica. 86: 83-85.
5. Doyle, J.J. 1991. DNA protocols for plants-CTAB total DNA isolation. In: Hewitt GM (ed) Molecular techniques in taxonomy. Springer, Berlin, pp 283-293.
6. IRRI. 1989a. Rice Races, Plant Types and Varietal Improvement. 2nd edn. Los Banos, Philippines.
7. IRRI. 1989b. Rice Races, Plant Types and Varietal Improvement. 2nd edn. Los Banos, Philippines.
8. Juliano, B.O. 1971. A simplified assay for milled-rice amylase. Cereal Sci. Today. 16: 334-338, 340-360.
9. Pratherpha, P. 2003. Characterization of *Waxy* microsatellite classes that are closely linked to the rice *Waxy* gene and amylase content in Thai rice germplasm. Songklanakarin J. Sci. Technol., 25(1): 1-8.
10. Shu, Q.Y., Wu. DX, Y.W. Xia, M.W. Gao, N.M. Ayres, P.D. Larkin and W.D. Park. 1999. Microsatellite polymorphisms on the *waxy* gene locus and their relationship to amylose content in *indica* and *japonica* rice, *Oryza sativa* L. Acta Genet Sinica 26: 350-358
11. Tan, Y.F., J.X. Li, S.B. Yu, Y.Z. Xing, C.G. Xu and Q. Zhang. 1999. The three important traits for cooking and eating quality of rice grains are controlled by a single locus in an elite rice hybrid, Shanyou 63. Theoretical Applied Genetics. 99: 642-648.
12. Temnykh, S., W.D. Park, N. Ayres, S. Cartinhour, N. Hauck, L. Lipovich, Y.G. Cho, T. Ishii and S.R. McCouch. 2000. Mapping and genome organization of microsatellite sequences in rice (*oryza sativa L.*). Theoretical Applied Genetics. 100: 697-712.
13. Tian, R., G.H. Jiang, L.H. Shen, L.Q. Wang and Y.Q. He. 2005. Maping quantitative trait loci underlying the cooking and eating quality of rice using a DH population. Molecular Breeding. 15: 117-124.

Downloaded from jcb.sanru.ac.ir at 2:10 +0430 on Monday May 27th 2019

Evaluation of Genetic Diversity By Using of Link Maker For Amylase Content of Some Iranian Local Rice Cultivars

M.R. Rahemi[1], S.K. Kazemitabar[2], A. Moumeni[3], A.A. Ebadi[4] and N. Farhadi[5]

Abstract

Molecular markers are the best method for investigating the genetic diversity. In this experiment, 72 cultivars including *Indica* and *Japonica* were investigated in Rice Research Centre of Iran. In order to evaluate the genetic diversity of locus *waxy* linked to the trait controlling the amylose content, PCR was performed using two oligonucleotides (484 and 485) and scored. The important Iranian cultivars of rice were screened using *waxy* microsatellite marker and classified into seven groups based on $(CT)_n$ repeats ranging from n=7 to 20. The amplified PCR products ranged from 102 to 128 bps in length and represented the $(CT)_n$ repeats of $(CT)_7$, $(CT)_8$, $(CT)_{14}$, $(CT)_{17}$, $(CT)_{18}$, $(CT)_{19}$ and $(CT)_{20}$, that were according to amylose content of cultivars in Iranian germplasm classified in seven groups for that locus and explained 70%, 72%, 78.95%, 80% and 70% of each group variations, respectively.

Keywords: Rice, *Waxy* microsatellite, Oligonucleotide, Amylose content

---

[1] B. Sc. Nuclear Science and Technology, Nuclear Technology Center Atomic Energy Organization of Iran

[2] Assistant professor, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University

[3] Assistant professor, Rice Research Institute, Rasht

[4] Researcher Instractur, Rice Research Institute, Rasht

[5] B. Sc. Institute of Standard and Indastrial Research of Iran