



نقشه یابی ژن آنتوسیانین ساقه برنج (*Oryza sativa* L.) با استفاده از نشانگرهای مولکولی ریزماهواره

طاهره ابراهیمی^۱، غلامعلی رنجبر^۲، قربانعلی نعمت زاده^۳ و غفار کیانی^۴

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری،

(نویسنده مسوول: ebrahimi_404@yahoo.com)

۲، ۳ و ۴- دانشیار، استاد و استادیار دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

تاریخ دریافت: ۹۱/۷/۲۴ تاریخ پذیرش: ۹۱/۱۲/۱۲

چکیده

وجود رنگدانه‌های آنتوسیانین در برنج و سایر گیاهان عامل اصلی تولید ساقه ارغوانی رنگ محسوب می‌شود. درک درست از مسیر بیوسنتزی آنتوسیانین باعث توسعه ابزار قدرتمندی در زمینه بیولوژی مولکولی و ژنتیک برنج می‌شود. برای مطالعه الگوی تفرق ژن آنتوسیانین ساقه تعداد ۱۲۳ تک بوته از جمعیت F2 حاصل از تلاقی ۱۸-۳۳ / DN- ندا A، مورد مطالعه قرار گرفت. تک بوته‌های F2 بر اساس رنگ ساقه مورد ارزیابی و طبقه‌بندی قرار گرفتند. تعداد بوته‌های رنگی (ارغوانی) ۸۳ و تعداد بوته‌های بی رنگ ۴۰ بوته مشاهده گردید و نسبت تفرق ۱: ۲/۰۷۵ بدست آمد. آماره t^2 برای این نسبت تفرق برابر با ۳/۴۸ بود که اختلاف معنی‌داری را از نسبت تفکیک ۱:۳ نشان نداد. این نسبت موید کنترل تک ژنی برای صفت مذکور می‌باشد. مطالعات مولکولی با استفاده از ۵۹ نشانگر مولکولی SSR، ۲۸ درصد پلی مورفیسم بین والدین را نشان دادند. آنالیز لینکاژ انجام شده روی بوته‌های مغلوب جمعیت F2 نشان داد که ژن آنتوسیانین ساقه روی بازوی کوتاه کروموزم شماره ۶ برنج واقع بوده و با نشانگر RM253 همبسته می‌باشد که در فاصله ۱۵ سانتی مورگان از ژن مورد نظر قرار دارد.

واژه‌های کلیدی: برنج، رنگدانه آنتوسیانین، رنگ ساقه، نشانگرهای SSR

مقدمه

برابر پاتوزن‌ها محسوب می‌شود (۳). متابولیت‌های ثانویه گیاهی نقش مهمی در کیفیت مواد غذایی (رنگ، طعم و بو) مختلف دارند و برای تولید دارو، رنگ، حشره کش‌ها، طعم دهنده‌های غذایی و عطر استفاده می‌شوند (۱۵). شناسایی مسیرهای بیوسنتزی

رنگدانه‌های آنتوسیانین نقش مهمی را نه تنها در توضیح تنظیم ژن و بیان مؤلفه‌ها در متابولیسم گیاه ایفا کرده است، بلکه به عنوان شاخصی از اثرات جانبی در تحمل گیاه به استرس‌های زیستی و غیرزیستی و دفاع در

نتیجه قطعاً دلایلی از همبستگی بین صفات خاص وجود دارد.

هدف از این پژوهش، مطالعه ژن کنترل کننده رنگ ساقه در ژنوم برنج و شناسایی جایگاه ژنومی آن از طریق مارکرهای SSR می‌باشد.

مواد و روش‌ها

جمعیت F₂ شامل ۱۲۳ ژنوتیپ از تلاقی بین دو رقم برنج ایرانی (۳۳-۱۸-DN / ندا A) به دست آمد. والد ۳۳-۱۸-DN با ساقه سبز رنگ، لاین جدیدی از برنج است که به تازگی توسط محققین پژوهشکده زیست فناوری کشاورزی طبرستان با استفاده از روش تلاقی برگشتی- شجره‌ای از تلاقی سپیدرود × سنگ جو اصلاح و در دست معرفی می‌باشد. رقم ندا A از طریق تلاقی برگشتی با لاین نرعی IR58025A اصلاح شده است و دارای ساقه ارغوانی رنگ است. به منظور تهیه نقشه لینکاژی جمعیت مورد مطالعه، ۵۹ نشانگر چند شکل SSR که توزیع خوبی روی ۱۲ کروموزوم برنج داشتند، بر اساس نقشه‌های موجود (۲، ۱۱، ۲۰) انتخاب شدند. آغازگرهای خریداری شده از شرکت متابیون (Metabion، Germany) به صورت منجمد و خشک و در غلظت‌های مختلف بوده و اطلاعاتی به همراه دارند که بر اساس آنها پرایمرها رقیق شدند.

نمونه‌های برگه از والدین و جمعیت F₂ تهیه و DNA ژنومی طبق روش CTAB (۱۴) و با کمی تغییرات استخراج گردید. واکنش

این ژن‌ها به اهدافی چون نقشه‌یابی ژن با مارکرهای مولکولی که ارتباط نزدیکی به آنها دارند کمک می‌کند (۱۶). نقشه‌یابی ژن‌ها و تهیه نقشه‌های ژنتیکی کاری اساسی در علم ژنتیک محسوب می‌شود. زیرا بخش عمده‌ای از علم ژنتیک با درک توارث صفات ویژه و دست ورزی آنها در ارتباط می‌باشد. این گونه اطلاعات به منظور به نژادی و شناسایی نسل‌های واجد صفات مطلوب به کار می‌رود. روشهای مولکولی با نشانمند کردن ژنها و گزینش به کمک نشانگر، برنامه‌های اصلاحی را سرعت بخشیده است (۴). شناسایی نشانگرهای مولکولی کاملاً پیوسته با ژن مورد نظر و مکان‌یابی آن، یک هدف مهم در اصلاح برنج است که با استفاده از این روش می‌توان بر پیچیدگی‌های روشهای اصلاحی متداول غلبه کرد. پیشرفت در بیولوژی مولکولی به همراه اصلاح اطلاعات از بیوسنتز آنتوسیانین منجر به افزایش ارقام و جهش یافته‌های گیاهی با رنگ‌ها و اشکال جدید شده است.

ژن آنتوسیانین در برنج دارای سه ژن اصلی است: C (رنگ ز)، A (فعال کننده) و P (توزیع کننده). لوکوس C روی بازوی کوتاه کروموزوم ۶ که وابسته به لوکوس wx می‌باشد نقشه‌یابی شده است (۱۲). ژنهای کنترل‌کننده صفت رنگ در برنج دارای توارث غالب هستند و در مطالعات مختلف به صورت تک ژنی (۵، ۱۷)، دو ژنی (۱۰) و چند ژنی (۱۳) گزارش شده‌اند. بین اندام‌های مختلف گیاه برنج از نظر تشکیل رنگ و تراکم رنگیزه‌های آنتوسیانین روابطی وجود دارد در

نرم‌افزار SPSS مورد آزمون قرار گرفت. ژنتیک مندلی ژن آنتوسیانین، تفرق گیاهان با ساقه سبز و ارغوانی در جمعیت F2 را بر مبنای تجزیه و تحلیل رنگ ساقه گیاه با ارائه تناسب خوبی با نسبت ۳:۱ (۸۳ گیاه با ساقه ارغوانی در برابر ۴۰ گیاه با ساقه سبز رنگ) آشکار نمود که نشان دهنده حضور یک ژن غالب برای تولید رنگ در ساقه رقم ندا می باشد (جدول ۱).

برای تهیه نقشه پیوستگی نشانگرهای ریز ماهواره در جمعیت F2 حاصل از تلاقی ندا/ DN-33-18، ۵۹ جفت آغازگر SSR مورد مطالعه قرار گرفتند که از این تعداد ۱۷ جفت نشانگر (۲۸ درصد) الگوی نوار بندی متفاوتی برای والدین مورد مطالعه به نمایش گذاشتند. تعداد معدودی از نشانگرها تنها در یکی از دو والد، باند تولید نمودند و برخی نیز فاقد محصول تکثیر یافته در هر دو والد بودند. چون این نشانگرها تفاوتی بیشتر از ۱۰ جفت باز بین والدین داشتند، نوارهای والدینی روی ژل های آگارز قابل تفکیک بودند. توالی آغازگرها و برخی اطلاعات مورد نیاز درباره آنها در جدول ۲ ذکر شده‌اند.

زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) در حجم ۱۵ μ l انجام شد. سیکل PCR در دمای واسرشته سازی ۹۴°C برای ۴ دقیقه، ۹۴°C برای ۴۵ ثانیه، دمای اتصال ۵۵°C برای ۴۵ ثانیه، ۷۲°C برای ۱ دقیقه و دمای گسترش نهایی ۷۲°C برای ۵ دقیقه انجام شد. دو راه برای تفکیک باندهای SSR وجود دارد، آکرلامید و دیگری آگارز متافور (چهار)، در این پژوهش برای بررسی محصولات PCR از ژل آگارز ۳٪ استفاده شد که با اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی شدند.

از داده‌های مولکولی و فنوتیپی دو والد و ۱۲۳ ژنوتیپ جمعیت F2 برای تعیین موقعیت کروموزومی ژن رنگ ساقه استفاده گردید. گروه های لینکاژ بر اساس نقشه‌های ژنتیکی SSR در برنج ارائه شده توسط مک کوچ و همکاران (۱۱) تعیین شدند. فواصل ژنتیکی براساس روش کوسمبی (۹) محاسبه و از روش حداکثر درست نمائی (۱) برای محاسبه میزان نوترکیبی با استفاده از بوته‌های مغلوب جمعیت F2 محاسبه گردیدند. آزمون نسبت مورد انتظار ۱:۲:۱ تفرق ژنوتیپ‌های نشانگر بوسیله آزمون χ^2 و با استفاده از

جدول ۱- آماره محاسباتی χ^2 با درجه آزادی ۱ برای صفت رنگ ساقه در جمعیت F2

کلاس فنوتیپی	فراوانی مشاهده شده	فراوانی مورد انتظار	میانگین مربعات (3:1) χ^2
ساقه ارغوانی	۸۳	۹۳	۳/۴۸
ساقه سبز	۴۰	۳۰	
کل	۱۲۳	۱۲۳	

مقدار بحرانی در سطح احتمالی ۵ درصد و درجه آزادی ۱، ۳/۸۴ می‌باشد.

جدول ۲- نشانگرهای چند شکل (پلی مورف) در این تحقیق به همراه توالی آغازگرهای رفت و برگشت و دمای اتصال آنها

پرایمر	کروموزم	توالی رفت	توالی برگشت
RM3148	۱	gactattgctcgaacacttg	ttgtctgcttggtatttgc
RM443	۱	gatggtttcatcggttacg	agtcccagaatgctgttcg
RM497	۲	tcctcttcacctatgggtgg	gccagtgctaggagagttgg
RM262	۲	cattccgtctcggctcaact	cagagcaaggtggcttgc
RM1358	۲	gatcgatgcagcagcatatg	acgtgtggctgcttttgc
RM1164	۳	cgtttctcccagaaaagtcg	caaggtggctgttgaggc
RM2422	۵	aacatgggaaacactaataa	aagattgaaccacagtgga
RM253	۶	tcctcaagagtgcmaaacc	gcattgtcatgtcgaagcc
RM587	۶	acgcgaacaattaacagcc	cttgctaccagtagatccagc
RM7027	۸	aggacctggactttatgggc	cctgcactgctccacagtac
RM447	۸	ccctgtgtctctctctc	acgggttcttctctctc
RM7390	۹	ctggttaacgtgagagctcg	gcagatcaattggggagtagc
RM1553	۹	aattagagggtccacatgtc	attaccctcattttctacgc
RM3152	۱۰	ggaagaggacaatcgacag	gactatctgaaaattcccatc
RM5620	۱۰	tcgacttgaagcatcacacc	tctgaaatgtcaagtgggcc
RM6085	۱۱	ggtgagagatggctaaagcg	catcggcctctagcacctcc
RM101	۱۲	gtgaatgtcaagtgacttaggtggc	acacaacatgttcctcccatgc

نتایج و بحث

DNA ژنومی حاصل از تعدادی گیاه کاملاً بی رنگ به طور جداگانه با هر یک از ۱۷ جفت نشانگر نشان دهنده پلی مورفیسم بین والدین مورد بررسی قرار گرفت. از میان این ۱۷ آغازگر، تنها آغازگر RM253 الگوی نواربندی مشابه بین لاین های والدینی و گیاهان کاملاً بی رنگ نشان دادند. آغازگر اخیر در ۱۲۳

ژنوتیپ F2 مورد مطالعه قرار گرفت و با استفاده از نوارهای الکتروفورز والدینی ژنوتیپ افراد مشخص گردید (شکل ۱). تجزیه پیوستگی نشان داد که ژن کنترل کننده رنگ ساقه برنج واقع در بازوی کوتاه کروموزوم ۶ می باشد. در میان ۲۰ بوته F2، دو گیاه با استفاده از جفت آغازگر RM253 به عنوان بوته های نو ترکیب شناسایی

(ارقام سپید رود، باسماتی، دم سیاه، قائم ۲ و نعمت به همراه لاین‌های F1×F1) نیز جهت اطمینان از نتیجه حاصله با این آغازگر مورد ارزیابی قرار گرفتند. الگوی نواربندی بدست آمده نشان دهنده این است که نشانگر RM253 به خوبی قادر به تفکیک ارقام دارای ساقه سبز از ارقام ساقه ارغوانی می‌باشد. الگوی نوار بندی بدست آمده نشان دهنده این است که پرایمر RM253 به خوبی قادر به تفکیک بوته‌های بی‌رنگ از رنگی می‌باشد.

شدند. نشانگر RM253 با فاصله ۱۵ سانتی مورگان روی کروموزوم ۶ قرار داشت. آزمون χ^2 برای بررسی انحراف فراوانی‌های ژنوتیپی نشانگر RM253 از فراوانی مورد انتظار مندلی (۱:۲:۱) در ۲۰ بوته F2 استفاده گردید (جدول ۳).

از آنجائی که نشانگر RM253 به خوبی قادر به تفکیک بوته‌های با ساقه ارغوانی از بوته‌های با ساقه سبز در جمعیت F2 مورد نظر بود، ارقام دیگری با ساقه ارغوانی (ارقام ندا، قائم ۱، خزر، F1 های رنگی) و ساقه سبز



شکل ۱- همبستگی نشانگر RM253 با صفت رنگ ساقه در تعدادی از بوته‌های F2 بدست آمده از تلاقی ندا/ DN-33-18. M: مارکر وزنی ۱۰۰ Kb. P1: ندا، P2: DN-33-18، A: ساقه ارغوانی، B: ساقه سبز.

تغییر رنگ در بخش‌های مختلف گیاه قابل مشاهده است. این ژنها در گیاه برنج دارای توارث غالب هستند و صفت رنگ ممکن است توسط یک، دو یا سه ژن کنترل شود. در پژوهش حاضر، تجزیه و تحلیل ژنتیک مندلی، عمل غالبیت یک جایگاه ژنی را با نسبت ۳:۱ آشکار نمود. در گذشته پژوهش‌های انجام شده توسط محققین روی صفت رنگ در

بسیاری از ژن‌های مسئول رنگ‌آمیزی در اندام‌های مختلف گیاه برنج مورد مطالعه قرار گرفته است. بیوسنتز فلاونوئید و آنتوسیانین از اولین مسیرهای متابولیت‌های ثانویه می‌باشد که مهندسی ژنتیک آنها صورت گرفت. دلیل این موضوع این است که مسیر بیوسنتز آنها به خوبی شناخته شده می‌باشد و نتایج تغییرات انجام شده به راحتی از روی

بخش‌های مختلف گیاه برنج اشاره به عمل غالبیت ناقص نیز داشته‌اند.

جدول ۳- آزمون χ^2 برای مقایسه فراوانی های ژنوتیپی نشانگر RM253 با فراوانی های مورد انتظار ۱:۲:۱ در جمعیت

F ₂				
نشانگر	هموزیگوت غالب (ارغوانی) A/A	هتروزیگوت (ارغوانی) A/B	هموزیگوت مغلوب (سبز) b/b	میانگین مربعات $\chi^2(1:2:1)$
RM253	۷	۱۰	۳	۳/۶**

** اختلاف معنی دار در سطح احتمال ۵٪ و درجه آزادی ۲.

سانتی مورگان قرار داشت (۱۹). همچنین در مطالعه دیگری (۶) در یک نمونه گیاه برنج دابل هاپلوئید (rdh)^۲ گزارش داد که صفت کلالة ارغوانی توسط یک ژن غالب کنترل می‌شود و تجزیه و تحلیل چند شکلی نشانگرهای میکروستلایت نشان داد که این ژن روی کروموزوم ۶ برنج به ترتیب در فاصله ۴/۲، ۰/۳۵ و ۰/۵۳ سانتی مورگان از نشانگرهای میکروستلایت RM276، RM253 و RM111 قرار دارد. وجود طیف وسیعی از عملکردها و انواع آنتوسیانین‌ها سوالات زیادی را در زمینه این که رنگ ارغوانی چه نقشی را در ساقه بازی می‌کند بر می‌انگیزد. اگر رنگ بنفش ساقه در جذب حشرات گرده افشان به گیاه کمک می‌کند، چه توضیحی در مورد واریته‌های متنوع برنج، خود گرده افشانی محصولات با ساقه بی‌رنگ و باروری بالا و همچنین بسیاری از واریته‌های برنج دارای ساقه بی‌رنگ و نسبت بذر بالا با توجه به این که متابولیت‌های ثانویه وظایف مختلفی در طول چرخه زندگی گیاه دارند می‌توانیم ارائه دهیم؟

در برنج با استفاده از افزایش لاین‌های مونوزومی ناسازگار (MAAL)^۱، (۸) مشخص شد که ژن کلالة ارغوانی (ps) دارای غالبیت مونوزنیک بوده و روی کروموزوم شماره ۳ *O. officinalis* قرار دارد (۱۹). همچنین با استفاده از لاین‌هایی با جایگزینی قطعات واحد (SSSI) یا به طور مختصر لاین‌های s-۳ نشان داده شد که ژن رنگ نوک دانه ارغوانی (ps) نیز مونوزنیک و غالب است که با نتایج به دست آمده در مطالعه حاضر مطابقت دارد. همچنین ژنوتیپ‌های نشانگرهای پلی مورفیک RM253، PSM349، PSM425 وراثت مندلی (۱:۲:۱) را نشان می‌دهند (۷). لاین‌های s-۳ از طریق سیستم‌های نزدیک به تلاقی برگشتی با کمک مارکرهای SSR ایجاد شدند. در این مطالعه موقعیت کروموزومی ژن آنتوسیانین ساقه گیاه حاصل از لاین رنگی در برنج تجزیه و تحلیل شده است. به طور جالب توجهی تالوکدار و ژانگ ژن رنگ نوک دانه را روی کروموزوم ۶ نقشه‌یابی نمودند. در مطالعه آنها ژن رنگ نوک دانه روی کروموزوم ۶ در مجاورت نشانگر RM253 با فاصله ژنتیکی ۰/۲

اصلاحی بپردازند. این مطالعه برای اولین بار موقعیت کروموزومی ژن رنگ ساقه گیاه حاصل از لاین رنگی را در برنج ایرانی تجزیه و تحلیل نموده است. لیکن تا کنون نشانگر SSR پیوسته با ژن رنگ ساقه روی کروموزوم ۶ گزارش نشده است. نشانگر RM253 که در این مطالعه با ژن رنگ ساقه گیاه همبستگی نشان داد، برای شناسایی لاین‌های دارای این ژن بسیار مفید می‌باشند و نتایج قابل اطمینان، موثر و کارآمدی را ارائه خواهد داد. با شناسایی نشانگرهای مولکولی همبسته با ژن، می‌توان از مزیت‌های انتخاب به کمک نشانگر مولکولی (MAS) (۱۸) در برنامه‌های اصلاحی برنج استفاده نمود.

تشکر و قدردانی

تمامی عملیات زراعی و آزمایشگاهی این تحقیق در پژوهشکده ژنتیک زیست فناوری کشاورزی طبرستان و با حمایت مالی این پژوهشکده انجام شده است که بدین وسیله مراتب تشکر و سپاس فراوان خود را تقدیم به کلیه همکاران این پژوهشکده می‌نماییم.

تهیه نقشه‌های مولکولی و شناسایی نواحی ژنومی کنترل کننده صفات اهمیت زیادی برای به‌نژاد گران برنج دارد به طوری که با علم به موضوع با دقت بیشتر و در مدت زمان کمتری می‌توان از طریق اجرای برنامه‌های انتخاب به کمک نشانگر به اصلاح این گونه صفات پرداخت. همچنین می‌توان از نشانگرهای مجاور آن برای احراز وجود یک صفت متناظر استفاده کرد. بدین ترتیب نیازی به انتظار برای ظهور آثار ژن نیست.

علیرغم مطالعات مختلف در سیستم‌های اصلاحی برنج، شناسایی و نقشه‌یابی ژن رنگ ساقه در بین ارقام ایرانی مطالعه نشده است.

تعیین الگوی تفرق برای صفات کمی و کیفی در برنج کمک موثری در شناخت ماهیت ژنتیکی آنها و راهنمای خوبی برای انتخاب و اداره نسل‌های در حال تفکیک می‌باشد. قطعاً انتخاب صفات مهم کیفی و کمی بستگی مطلق به درصد وراثت‌پذیری آنها و الگوی تفرق یا رفتارهای اصلاحی آنها دارد. اطلاع از ماهیت ژنتیکی صفات این فرصت را به به‌نژادگرها می‌دهد تا با آمادگی بیشتر و بهتر به کار

منابع

1. Allard, R.W. 1956. Formulas and tables to facilitate the calculation of recombination values in heredity. *Hilgardia*, 24: 235-278.
2. Chen, X., S. Temnykh, Y. Xu, Y.G. Cho and S.R. McCouch. 1997. Development of a microsatellite framework map providing genome-wide coverage in rice (*Oryza Sativa L.*). *Theoretical and Applied Genetics*, 95: 553-567.
3. Fitter, A.H. and R.K.M. Hay. 2001. *Environmental physiology of plants*. Academic Press. 367 pp.
4. Flowers, T.J. and A.R. Yeo. 1995. Breeding for salinity resistance in crop plants. *Australian Journal of Plant Physiology*, 22: 875-884.

5. Gealy, D.R., Y. Wengui and J.N. Rutger. 2006. Red rice (*Oryza sativa*) plant types affect growth, coloration, and flowering Characteristics of first- and second-generation crosses with rice. *Weed Technology*, 20: 839-852.
6. Han, L., T. Zhang, X.U. Jian-Di, L.I. Yun, X.U-Dung Wang and Xianjun Wu. 2006. Genetic analysis and gene mapping of purple stigma in rice. *Acta Genetica Sinica*, 33(7): 642-646
7. He, F.H., Z.Y. Xi, R.Z. Zeng, A. Talukdar and G.Q. Zhang. 2005. Developing single segment substitution lines (SSSLs) in rice (*Oryza sativa* L.) using advanced backcrosses and MAS. *Acta Genetica Sinica*, 32: 825-831.
8. Jena, K. and G.S. Khush. 1990. Monosomic alien addition lines of rice: production, morphology, cytology and breeding behavior. *Genome* 32: 449-455.
9. Kosambi, D.D. 1944. The estimation of map distances from recombination values. *Annals Eugenics*, 12: 172-175.
10. Kumari, P., U. Ahuja, V. Chawla and R.K. Jain. 2009. Genetics of apiculus, hull and pericarp colour and awnedness in Basmati rice progenies. *ORYZA- An International Journal on Rice.*, 46: 149-151.
11. Mc Couch, S.R., L. Teytelman, Y. Xu, K. Lobos, K. Clare, M. Fu, B. Walton, R. Li, Z. Maghirang, X. Xing, I. Kono, M. Yano, R. Fjellstrom, G. DeClerck, D. Scheneider, S. Cartinhour, D. Ware and L. Stein. 2002. Development and mapping of 2240 new SSR markers for rice (*Oryza sativa* L.). *DNA Research*, 9: 199-207.
12. Mikami, I., A. Takahashi Sano and Y. thidar. 2000. A candidate for C (Chromogen for anthocyanin) gene. *Rice Genetics Newsletter*, 17: 54-56.
13. Monta, S., W. Matthayathaworn, S. Uckarach and T. Sreewongchai. 2010. Inheritance of thermo sensitive genetic male sterility and stigma color in AnxiangS rice variety. *Proceeding of 48th Kasetsart University Annual Conference, Plants, Bangkok Bangkok, Thailand.* 587-592 pp.
14. Murray, M.G. and W.F. Thampson. 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Research*, 8: 4321-4325.
15. Nicolosi, E., Z.N. Deng, A. Gentile, S. La Malfa, G. Continella and E. Tribulato. 2000. Citrus phylogeny and genetic origin of important species as investigated by molecular markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 100: 1155-1166.
16. Reddy, A. 1996. The tissue-specific distribution and accumulation of anthocyanin pigments are determined by additional loci. In: *Rice Genetics III. Proceedings of the third International Rice Genetics Symposium, 16-20 Oct 1995.IRRI, Manila, Los Banos, (Philippines), 341-351 pp.*
17. Shi, B.Z., H. Sun Can, L.P. Chen and Z.M. Yang. 2002. Inheritance and utilization of purple characters of Zi x iang dao rice in Guizhou. *Seed*, 2: 29-30.
18. Spelman, R. and H. Bovenhuis. 1998. Genetic response from marker assisted selection in an outbred population for differing marker bracket sizes and with two identified quantitative trait Loci. *Genetics*, 148: 1389-1396.
19. Talukdar, A. and G. Zhang. 2006. 3-8 Lines and molecular tagging of the gene for purple apiculus in rice (*Oryza sativa* L.). *Indian Journal of Genetics*, 66(4): 271-274.
20. Temnykh, S., G. DeClerck, A. Lukashova, L. Lipovich, S. Cartinhour and S.R. McCouch. 2001. Computational and experimental analysis of microsatellites in rice (*Oryza sativa* L.): frequency, length variation, transposon associations and genetic marker potential. *Genome Research*, 11: 1441-1452.

Molecular Tagging of Stem Anthocyanin Gene in Rice Using SSR Markers

Tahereh Ebrahimi¹, Gholam Ali Ranjbar², Ghorbanali Nematzadeh³ and Ghaffar Kiani⁴

1- Former MSc Student, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University (Corresponding author: ebrahimi_404@yahoo.com)

2, 3 and 4- Associate Professor, Professor and Assistant Professor, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University

Received: October 15, 2012

Accepted: March 2, 2013

Abstract

Anthocyanin pigments are responsible for production of purple stem in rice. Proper understanding of anthocyanin pigmentation may lead to the development of a powerful tool in rice genetics and molecular biology. Segregation mode of stem anthocyanin gene is studied on 123 individual plants from an F₂ population derived from Neda/DN-33-18 cross. Plants evaluated based on stem color as purple and colorless classes. Segregating of 83 purple to 40 colorless plants revealed that monogenic Mendelian inheritance governed on this trait. Molecular analysis using 59 microsatellite markers showed that 17 (28%) were polymorphic between parents. Linkage analysis on recessive individuals from F₂ population showed that the stem anthocyanin gene has associated with SSR marker RM253 located on short arm of chromosome 6 in rice genome.

Keywords: Rice, Stem color, Tagging, SSR markers