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

مقدمه

برنج (*Oryza sativa* L.) يكي از محصولات غذايي مهم در دنياست و ماده غذايي اصلي مصرفي بيش از نيمي از 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 (۳ 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 bp ۵۵ 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 الیگونكلاوتيدهاي ۴۸۴ و ۴۸۵ با توالي ۲۰ و ۲۱ نوكلاوتيدي (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 ۱۲۷_{bp}-۱۳۰ و توالي تكراري $(CT)_n$ را (n =۸ تا n =۲۰) [۲۰، ۱۹، ۱۸، ۱۷، ۱۶، ۱۴، ۱۱ و ۸] گزارش كرده‌اند. بدين ترتيب كه توالي‌هاي $(CT)_{۱۹}$ و $(CT)_{۱۸}$ $(CT)_{۱۷}$ داراي مقادير پايين آميلوز (۱۷%-۱۴) و ارقام داراي توالي‌هاي $(CT)_{۱۴}$ و $(CT)_{۸}$ و $(CT)_{۲۰}$ داراي مقادير متوسط (۲۲%-۲۱) و ارقام با توالي $(CT)_{۱۱}$ داراي مقادير بالاتر آميلوز (۲۵%) هستند و يكي از ارقام بدون آميلوز داراي توالي $(CT)_{۱۶}$ 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. پ5 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 ۱۶ 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

پائين) بود كه قطعات DNA سنتز شده در ابتداي اگزون ۱ و اينترون ۱ از ژن *Waxy* قرار دارند، ۱۰ دسته ريزماهواره شناسائي كرد كه كند شدن ميان ارقام برنج با آميلوز بالا و متوسط و پائين را نشان دادند.

بائو و همكاران (۲) در آزمايشي روي ۵۱ رقم برنج ۴ آلل ريزماهواره در توالي تكراري $(CT)_n$ شامل n برابر با ۱۶، ۱۷، ۱۸ و ۱۹ در مكان ژن *Waxy* در برنج‌هاي *Waxy* مشاهده نمودند، كه $(CT)_{17}$ بيشترين فراواني را در بين اين ارقام داشت. تمنيه و همكاران (۱۲) ۱۸۸ گزارش نمود كه در مكان ژني OSR19 ۷ آلل روي ۵۳۲ رقم مشاهده كرده است. تيان و همكاران (۱۳) صفات ميزان آميلوز، درجه ژلاتينه شدن، ميزان جذب آلكالي و افزايش طول برنج پخته شده را در ارقام دابل هاپلوئيد را مورد بررسي قرار دادند و مشخص كردند كه براي اين صفات بيشترين سهم مكاني روي بازوي كوتاه كروموزوم شماره ۶ با مركزيت آغازگر RM190 قرار دارد.

نتايج محققين در تركيب با گزارشات پيشين بيشتر روي اين مساله تاكيد مي‌كند كه ژن *Waxy* يا بخش منطقه ژني كاملا پيوسته با آن نقش مهمي را در تعيين كيفيت پخت برنج بازي مي‌كند. در آزمايشات صورت گرفته ميزان آميلوز توسط بخش مكان ژني ساده الگو بزرگي در ميزان آميلوز پائين، متوسط و بالا دارد. هدف اصلي از اين مطالعه بررسي تنوع در مكان ژني *Waxy* با استفاده از نشانگرهاي مولكولي در ارقام برنج بومي ايران مي‌باشد.

مواد و روش‌ها

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

با استفاده از روش CTAB، DNA برگ‌هاي تازه برنج استخراج شد (۵) و پس از آن كيفيت و كميت DNA استخراج شده با استفاده از روش اسپكتروفتومتر و ژل آگارز مشخص شد. ميزان آميلوز براساس روش juliano (۸) با استفاده از روش اسپكتروفتومتر اندازه‌گيري شد. پرايمر مورد استفاده براي افزايش تعداد ريزماهواره در بازوي كوتاه كروموزوم شماره ۶ با اليگو نوكلئوتيد هاي ۴۸۴ و ۴۸۵ مشخص شد. براي ارزيابي ريزماهواره، واكنش‌هاي زنجيره‌اي پليمراز محتوي ۱۰ ميكروليتر بود كه از اين مقدار ۲ ميكروگرم آن DNA برنج، ۰/۵ ميكرو ليتر آن هر پرايمر از جفت پرايمرها، ۰/۴۸ ميكروليتر كلريد منيزيم، ۱/۲ ميكروليتر dNTPs، ۱ ميكروليتر بافر PCR و ۰/۱۳ واحد آنزيم تك پليمراز بود. واكنش زنجيره‌اي پليمراز طي ۲۴ چرخه در دماهاي $95^{\circ}C$ به مدت ۴۵ ثانيه، $55^{\circ}C$ به مدت ۴۵ ثانيه و $72^{\circ}C$ به مدت ۶۰ ثانيه صورت مي گرفت و در نهايت در دماي $72^{\circ}C$ به مدت ۵ دقيقه تكميل مي‌يافت. رنگ فرم آميد به محصول واكنش زنجيره‌اي پليمراز در دماي $95^{\circ}C$ به مدت ۵ دقيقه واسرشت شده و به سرعت روي يخ خنك شده

است اضافه شد، سپس ۵ آ ميكرولیتر از نمونه از روي ژل اگريل آميد آ% به مدت ۱ ساعت با توان ۱۰۰ وات با استفاده از توالي ژل بيوراد عبور داده شد. محصول واكنش زنجيره‌اي پليمراز به واسطه ايجاد الگوهاي نقره‌اي رنگ و با امتيازبندي اين الگوها مشخص شد.

جدول ۱- ليست ارقام برنج و اندازه توالي تكراري CT براي مكان ژني *Waxy*

رديف	رقم	$(CT)_n$	ميزان آميلوز (%)
۱	قصرالدشت	۸	۲۱/۳
۲	طارم اميري	۱۹	۲۳/آ۹
۳	غريب	۱۴	۲۳/۸۹
۴	شاهپسند	۱۸	۲۴/۱۴
۵	حسن‌سرائي	۱۴	۲۳/۳۹
آ	زيربندي	۱۷	۲۳/۲آ
۷	ساعري	۸	۲۱
۸	رشتي	۸	۲۱/۹آ
۹	صدري	۷	۲۰/۴
۱۰	آبجي بوجي	۸	۲۰/۰۲
۱۱	قشنگه	۸	۱۲/۴۷
۱۲	محمدي شپسر	۸	۲۷/۷آ
۱۳	موسي طارم	۱۷	۱۹/۸۳
۱۴	رشتي سرد	۸	۲۱/۹آ
۱۵	اهلمي طارم	۸	۲۲
۱آ	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	۲۲/۲آ
۲۴	حسن‌سرائي آتشگاه	۸	۲۲/۳۳
۲۵	حسن‌سرائي غلامي پيچيده	۸	۲۱/۰۵
۲آ	زيره	۸	۲۵/۳۳
۲۷	مير طارم	۸	۲۲/آ
۲۸	علي كاظمي	۸	۲۰/۸۴
۲۹	دادرس	۱۴	۲۰/آ۲
۳۰	محمدي شپسر	۱۴	۲۳
۳۱	سرخه	۱۸	۲۴/۹۱
۳۲	هاشمي	۱۸	۲۴/۷۹
۳۳	شمال بودار	۸	۲۴/۵آ

ادامه جدول ۱- ليست ارقام برنج و اندازه توالي تكراري CT براي مكان ژني *Waxy*

رديف	رقم	$(CT)_n$	ميزان آميلوز (%)
۳۴	فارسي ۱	۲۰	۲۵/۷۹
۳۵	دم‌سرخ	۸	۱۷/۳۱
۳۶	طارم دشتورورگهان	۱۸	۲۳/۲۹
۳۷	ميانه	۸	۲۰/۸۶
۳۸	دمسياه	۱۸	۲۶/۳
۳۹	زاينده رود	۱۴	۱۸/۵۲
۴۰	پاÿ غريب دمدار	۱۴	۲۳/۷۸
۴۱	بينام	۱۴	۲۱/۲۶
۴۲	يكي	۸	۱۷/۳۳
۴۳	مرجو	۱۴	۱۵/۲۵
۴۴	شاهي	۱۴	۱۵/۱۹
۴۵	شصتG ملكي	۸	۲۰/۸۶
۴۶	علم سبز	۱۸	۲۳/۸۷
۴۷	حسني رzاوانشهر	۱۴	۲۴/۶۱
۴۸	گلي	۲۰	۲۱/۰۷
۴۹	ساري šلتيG	۱۴	۲۰/۱
۵۰	ديلماني	۱۴	۲۴/۵
۵۱	درودزن فارسي	۸	۲۰/۸۷
۵۲	بژي	۱۷	۱۵/۴۹
۵۳	سفيد	۱۸	۱۲/۵۳
۵۴	غريب دمدار	۱۸	۲۳/۲۱
۵۵	گرم صدري	۱۸	۲۴/۹۲
۵۶	šمئا بودار	۸	۲۲/۲۵
۵۷	صدري دمسياه	۸	۱۸/۳۶
۵۸	صدري دور	۱۷	۱۸/۵۵
۵۹	شلتوك šمئا سر تlون	۱۷	۱۶/۳۰
۶۰	رzااجو	۷	۱۴/۵۸
۶۱	صدري دم‌سرخ	۷	۱۲/۳
۶۲	نگوران	۷	۱۳/۷۲
۶۳	گرده لرستان	۱۴	۱۱/۹۶
۶۴	طارم دمسياه	۸	۲۰
۶۵	فارسي ۲	۷	۱۰/۵۱
۶۶	برنج šمئادويلون	۷	۱۳/۹۷
۶۷	فارسي ۴	۷	۲۲/۹۵
۶۸	صدري دم‌سفيد	۱۴	۲۰/۳۷
۶۹	ميرطارم	۷	۱۳/۲۳
۷۰	سنگري	۷	۱۲/۰۲
۷۱	عنبربو ايلام	۱۴	۲۲/۹۴
۷۲	صدري موÈيي	۷	۲۰/۴۷

نتايج و بحث

۷۲ واريته برنج از نقطه نظر مهمترين ژرم‌پلاسم‌هاي ايراني با استفاده از مارکرهايي که در مجاورت ريز ماهواره‌هاي ژن واکسي بودند ارزيابي شدند. کليه واکنش‌هاي 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 چسبي داراي ميزان آميلوز (۲%-۱)، در ارقامي که ميزان چسبين پايين بود، ميزان آميلوز (۲۰%-۱۰)، در ارقامي با ميزان چسبين متوسط ميزان آميلوز (۲۵%-۲۰) و در ارقامي با ميزان چسبين بالا، ميزان آميلوز (۳۰%-۲۵) بود (آ و ۷). در اين تحقيق، ميزان آميلوز با استفاده از واکنش زنجيره‌اي پليمراز به دست آمده است. براساس اطلاعات به دست آمده از تحقيق حاضر، ۷ دسته از ريز ماهواره‌هاي واکسي که شامل تکرار هاي $(CT)_n$، (به ترتيب از n=۷ تا n=۲۰) بودند مشخص شد. بر اين اساس، واريته هايي که در اين ۷ دسته قرار گرفتند، اغلب در ۴ گروه طبقه‌بندي شدند. محصولات واکنش زنجيره‌اي پليمراز در فاصله باندي (۱۲۸-۱۰۲ bps) قرار گرفتند و تکرارهاي $(CT)_n$ که شامل $(CT)_۷$، $(CT)_۸$، $(CT)_{۱۴}$، $(CT)_{۱۷}$، $(CT)_{۱۸}$، $(CT)_{۱۹}$ و $(CT)_{۲۰}$ 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 که غير واکسي بودند به قرار زير است. ۱۰ رقم برنج داراي آلل $(CT)_۷$ بودند که ۷۰% از اين واريته‌ها در گروه واريته‌هايي با آميلوز پايين (رو به پايين) قرار گرفتند. ۲۵ رقم برنج داراي $(CT)_۸$ بودند و ۷۲% از اين ارقام در گروه واريته هايي با آميلوز متوسط رو به پايين قرار گرفتند. ۱۹ رقم برنج داراي آلل $(CT)_{۱۴}$ بودند که ۷۸/۹۵% از اين ارقام در گروه واريته هايي با آميلوز متوسط قرار گرفتند. ۵ واريته داراي آلل $(CT)_{۱۷}$ بودند و ۸۰% از اين ارقام در گروه واريته هايي با آميلوز پايين رو به بالا قرار گرفتند. ۱۰ رقم برنج داراي آلل $(CT)_{۱۸}$ بودند که ۷۰% از اين ارقام در گروه واريته هايي با آميلوز متوسط رو به بالا قرار گرفتند. ارقام باقيمانده نيز داراي آلل هاي $(CT)_{۱۹}$ و $(CT)_{۲۰}$ بودند.

تکرار هاي $(CT)_۴$، $(CT)_۷$، $(CT)_۹$، $(CT)_{۱۰}$، $(CT)_{۱۱}$، $(CT)_{۱۲}$ و $(CT)_{۱۳}$ در ژرم پلاسم‌هاي ايراني مشاهده نشد اين در حالي است که اين تکرارها در ارقام برنج ايالات متحده آمريکا (۱ و ۴) مشاهده و گزارش شد. همچنين ۷ آلل مختلف در ژرم پلاسم هاي ارقام برنج تايلندي (۹) نيز گزارش شد. دسته $(CT)_۸$ به طور گسترده‌اي در تکرارهاي ژني ارقام ايراني موجود بود و ۲۵ رقم از ارقام مورد آزمايش در اين دسته قرار گرفتند.

دسته $(CT)_{۱۸}$ تنها در ارقام برنج چسبي بومي (ارقام برنج تحت کشت و ارقام وحشي) مشاهده شد. در مقابل کليه ارقام غير چسبي در برنج با ميزان آميلوز بالا (بيشتر از ۲۵%) در دسته $(CT)_{۱۱}$ قرار گرفتند. در اين راستا نتايج مشابهي در نمونه هاي برنج ايالات متحده آمريکا نيز گزارش شد (۱).

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

بنابراين در ارقام برنج تايلندي دسته هاي ريز ماهواره هاي *WX* at داراي پلي مورفيسم هستند سبب شد at اغلب نژاد هاي برنج در دسته هايي با آميلوز متفاوت قرار گرفته و از يڵديگر متمايز گردند. اين ريز ماهواره ها at لينڵاژ زيادي با ژن واtسي دارنداز پتانسيل مناسبي جهت استفاده در برنامه هاي اصلاحي برڵوردارند. اصلاح tنندگان برنج نيز از اين پتانسيل براي رديابي ژنهاي واtسي از ۂين هاي منتخب، بدون ارزيابي tيفيت دانه حاصل از تلاقي دو واريته استفاده مي tنند. با اين همه، دۂيل احتمالي در بروز تفاوت هاي ريز ماهواره هاي واtسي در ميان ارقام برنج ژۂتيني حاtي از اين امر مي باشد at نمونه برداري به ميزان ۂزم صورت نگرفته است همڿنين، شجره ارقام برنج در اين مطالعه مشخDŽ نشده است. با اين همه، تفاوت ها، نشاندهنده تمايز حقيقي ميان ژنوم برنج هايي at توسnj افراد و tشاورزان ايراني بومي شده اند، است. همڿنين ارقام مورد استفاده در اين تحقيق تفاوتي را در فراواني توزيع ريز ماهواره هاي واtسي در نواحي مختلڵ نشان دادند. ارقام برنج بومي و مطالعات تڵامل تدريجي، اطلاعات ارزشمندي را درباره تفاوت ژنتيڵي فراهم مي tند. ارقام برنج بومي ايران از ںر مطالعات موڵولي بايستي بيشتر مورد بررسي قرار بگيرند. بنابراين بررسيهاي همه جانبه ژرم پلاسم هاي ارقام برنج بومي ايراني از ںر تفاوت در ريز ماهواره هاي واtسي tارا مي باشند. مطالعاتي at در گۂشته انجام شده نشان داد at ۷ آلل ريز ماهواره $(CT)_n$ ۵۵-bp در ڵلاڵ جهت سر ۵ فرjاي جايگاه اتصال انترون ها به هم در ژن هاي واtسي قرار دارد (۱، ۲، ۴ و ۱۰). اين آلل ها مي توانند درصد باۂي از تفاوت در ميزان آميلوز در برنج را بيان tنند (۱، ۲، ۳ و ۱۰). براساس تحقيقاتي at روي ژرم پلاسم هاي ارقام برنج ايا۔ت متحده و تايلند صورت گرفته در هيج تحقيقي دسته $(CT)_۷$ گزارش نشده است. نتايج حاصل از اين تحقيق نشان داد at در ميان ارقام تنها در رقم دمسياه ميزان آميلوز متوسnj نسبت به ميزان آميلوز پايين و با۔، بيشتر مشاهده شد.

تشكر و قدرداني

تشڵر و سڳاس از ڵانم‌ها فرهادي، tاتوزي و نويريان و آقاي توسلي و مرtز تحقيقات برنج ايران at صميمانه مواد آزمايشگاهي را در اڵتيار اينجانب قرار دادند.

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 physicochememical 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.

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