



## ارزیابی کمی و مولکولی تحمل به تنش خشکی ژنوتیپ‌های برنج

رضا کریم کشته<sup>۱</sup> و حسین صبوری<sup>۲</sup>

۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، دانشگاه پیام نور کرج، (نویسنده مسوول: rezakarim597@yahoo.com)

۲- دانشیار، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه گنبدکاووس

تاریخ دریافت: ۹۳/۱۱/۲۱ تاریخ پذیرش: ۹۶/۳/۲۲

### چکیده

اصلاح برنج برای تحمل به خشکی نیازمند ارزیابی صحیح تنوع موجود در جمعیت‌های اصلاحی و تجزیه ژنتیکی شاخص‌های مرتبط با تحمل به خشکی است. به منظور بررسی شاخص‌های تحمل به تنش و شناسایی ژنوتیپ‌های متحمل به شرایط تنش خشکی، ۵۹ ژنوتیپ برنج در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با ۳ تکرار در دو شرایط غرقاب و تنش خشکی در سال زراعی ۹۲ مورد آزمایش قرار گرفتند. در این تحقیق ارتباط بین شاخص‌ها و نشانگرهای مولکولی در برنج با استفاده از ۱۰ شاخص و ۱۸۹ مکان ژنی حاصل از ۳۶ جفت نشانگر SSR و ۱۴۴ مکان ژنی حاصل از ۱۰ جفت نشانگر ISSR بر روی ۵۹ ژنوتیپ برنج در شرایط غرقاب و تنش خشکی مورد مطالعه قرار گرفت. تحلیل همبستگی بین عملکرد در شرایط غرقاب و تنش خشکی و شاخص‌های YI و HM، GMP، MP، STI، SSI را به عنوان شاخص‌هایی برتر در هر دو شرایط غرقاب و تنش خشکی که قادرند ژنوتیپ‌های مقاوم با عملکرد بالا را نشان دهند انتخاب نمود. براساس تجزیه رگرسیون گام‌به‌گام داده‌های مولکولی ریزماهوره و بین ریزماهوره با شاخص‌ها، در مجموع به ترتیب ۵۷ و ۴۴ نشانگر آگاهی بخش با شاخص‌ها شناسایی شد. بیشترین توجه تغییرات بر اساس داده‌های ریزماهوره مربوط به شاخص تحمل به تنش (STI) با ۵۴۱٪ توسط مکان‌های ژنی RM5780، RM6324-B، RM3294-B، RM5424-D، RM7118-B، RM8206-C، RM549-E، RM462-B، RM5424-E، RM5780-G تبیین شد و بیشترین توجه تغییرات براساس داده‌های بین ریزماهوره مربوط به شاخص عملکرد (YI) با ۴۶۹٪ توسط مکان‌های ژنی ISSR3-1، ISSR1-6، ISSR1-8، ISSR9-1، ISSR2-8، ISSR10-8، ISSR10-10 بود. از نتایج این تحقیق در تأمین اطلاعات اولیه برای انتخاب غیرمستقیم صفات مفید از طریق نشانگرهای مولکولی می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: برنج، رگرسیون گام‌به‌گام، شاخص‌ها تحمل به تنش، SSR، ISSR

### مقدمه

پژوهشگران اغلب از صفات مورفولوژیک در ارزیابی‌های تنوع ژنتیکی و ارتباط بین ژنوتیپ‌های یک گونه خاص استفاده می‌کردند. دو نقیصه، محدود بودن تعداد نشانگرهای مورفولوژیک و متاثر بودن آنها از عوامل محیطی سبب شد کاربرد اینگونه نشانگرها محدود شود. پیشرفت علوم بیوتکنولوژی و شناسایی نشانگرهای مولکولی به ویژه نشانگرهای مبتنی بر DNA سبب ایجاد تعداد نامحدودی نشانگر و حذف اثرهای ناشی از عوامل محیطی شده که توانسته بسیاری از مشکلات مربوط به نشانگرهای مورفولوژیک را برطرف کند و تکمیل‌کننده نشانگرهای مورفولوژیک باشد. در سال‌های اخیر نشانگرهای پیوسته با صفات مطلوب زراعی و کاربرد آنها در تجزیه وراثت صفات در گیاهان زراعی و ساختار و سازماندهی ژنوم مشخص شده است (۱۶، ۱۵). در حال حاضر مهم‌ترین شاخص تحمل به تنش خشکی مورد استفاده در برنامه‌های به‌نژادی ارزیابی عملکرد دانه در شرایط غرقاب و تنش خشکی است. درک مکانیسم‌های فیزیولوژیک که قادر به سازگار شدن گیاه در شرایط محدودیت رطوبتی بوده و باعث حفظ رشد و تولید در طول دوره خشکی می‌شوند می‌تواند در انتخاب ژنوتیپ‌های متحمل به خشکی و استفاده از این صفات در برنامه‌های اصلاحی موثر باشد (۲۸). شاخص‌های متفاوتی برای ارزیابی واکنش گیاهان در شرایط محیطی مختلف و تعیین مقاومت و حساسیت آنها ارائه شده است. روزیل و هامبلین (۲۰) شاخص تحمل (TOL) و میانگین بهره‌وری (MP) را ارائه کردند.

برنج نیازهای تغذیه‌ای حدود نیمی از جمعیت جهان را تأمین می‌نماید. با توجه به رشد زیاد جمعیت در آسیا، جایی که حدود ۹۰ درصد برنج دنیا در آن تولید و مصرف می‌شود، تولید سالیانه برنج باید حدود ۱/۷ درصدافزایش یابد تا نیاز مصرف کنندگان تأمین شود (۴). تولید غذای جهان عمدتاً به وسیله تنش‌های محیطی و عوامل بیماری‌زا محدود شده است که در میان انواع تنش‌ها، تنش خشکی دارای اهمیت بسزایی است (۲۹). تخمین زده می‌شود که حدود ۲۰۰ میلیون تن از محصول برنج در اثر تنش‌های محیطی، بیماری و آفات از بین می‌رود و تنش خشکی تقریباً در ۵۰ درصد از اراضی تولید برنج دنیا اتفاق می‌افتد (۲). یکی از یافته‌های مهم طی چند دهه گذشته در زمینه اصلاح نباتات، شناخت وجود سرمایه عظیم تنوع ژنتیکی در گیاهان بوده است (۲۷، ۱۳). برای استفاده مناسب از این سرمایه عظیم، اطلاع از ماهیت و میزان تنوع موجود در ژرم پلاسما، از اهمیت بسیار زیادی برخوردار است (۲۲). تخمین میزان تنوع ژنتیکی به‌عنوان یکی از گام‌های پایه‌ای و اساسی در نگهداری و حفاظت مواد ژنتیکی در بانک بذر و اجرای برنامه به‌نژادی است (۹، ۱۴). به عبارت دیگر ارزیابی تنوع ژنتیکی برای مدیریت مؤثر و حفظ منابع ژرم پلاسما و همچنین اجرای برنامه‌های به‌نژادی دارای اهمیت فراوانی می‌باشد والدینی که از لحاظ ژنتیکی متفاوت هستند هیبریدهایی با هتروزیس بالاتر تولید می‌کنند و احتمال به دست آوردن نتایج نوترکیب را افزایش می‌دهند (۲۱). پیش از شناسایی و کاربرد نشانگرهای مولکولی، محققان و

برنج در شرایط نرمال و تنش خشکی با استفاده از سیستم نشانگری ریزماهوره‌ای و بین ریزماهوره‌ای بود.

### مواد و روش‌ها

#### آزمایش مزرعه‌ای و اندازه‌گیری صفات

به منظور ارزیابی تحمل ژنوتیپ‌های برنج به تنش خشکی شناسایی نشانگرهای مرتبط با عملکرد در ۵۹ ژنوتیپ دریافتی از موسسه تحقیقات برنج کشور و موسسه بین المللی تحقیقات برنج (جدول ۱) آزمایشی در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار در دو شرایط جداگانه، بدون تنش (غرقاب) و تنش خشکی در مزرعه پژوهشی واقع در شهرستان علی آباد کتول با طول جغرافیایی ۵۴/۵۱ شرقی و عرض جغرافیایی ۳۶/۵۴ شمالی با ارتفاع ۱۳۶ متر از سطح دریا، در سال زراعی ۱۳۹۲ انجام شد. این منطقه از نظر آب و هوای جزء اقلیم معتدل و مرطوب محسوب می‌شود و دارای زمستان‌های سرد و تابستان گرم می‌باشد. در هر دو شرایط (نرمال و تنش خشکی) ژنوتیپ‌ها در پنج ردیف به صورت ۲۵ × ۲۵ سانتی‌متر در ردیف‌هایی به طول یک متر کشت شدند. سی روز پس از کاشت در خزانه، گیاهچه سالم و قوی به زمین اصلی منتقل شدند. عملیات زراعی مورد نیاز در طول دوره رشد و نمو بوته‌ها در شرایط تنش و نرمال به طور یکسان انجام شد و فقط از نظر آبیاری مزرعه آزمایشی در هر دو محیط غرقاب و تنش، تا مرحله پنجه‌دهی ارقام به طور یکسان به طور غرقاب انجام شد سپس برای ایجاد تنش، آبیاری از ۴۰ روز پس از نشاء (مرحله حداکثر پنجه‌زنی) تا پایان فصل زراعی به فاصله ۲۵ روز انجام شد. اندازه‌گیری ارزش‌های فنوتیپی عملکرد دانه و وزن هزار دانه در دو شرایط بر اساس دستورالعمل استاندارد ارزیابی صفات در برنج انجام شد (۲۶). برای عملکرد دانه کل دانه‌های پر هر ژنوتیپ در هر تکرار بعد از رسیدن کامل دانه‌ها برداشت شد و سپس با ترازوی حساس مورد توزین قرار گرفت و سپس میانگین سه تکرار در هر شرایط آبیاری محاسبه شد و برای ارزیابی شاخص‌های تحمل به خشکی استفاده شد. برای تعیین خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک نمونه‌ای از سطح خاک (۰-۳۰ سانتی‌متر) تهیه و تجزیه آن در آزمایشگاه آب و خاک انجام شد. نتایج حاصل از تجزیه خاک در جدول (۲) آمده است.

فیشر و مورر (۸) شاخص حساسیت به تنش (SSI) را پیشنهاد کردند. فرناندز (۷) شاخص تحمل به تنش (STI) و میانگین هندسی (GMP) را معرفی کرد. فرناندز (۷) خصوصیات مهم یک شاخص خوب برای بررسی و تظاهر مقاومت به خشکی را وجود تنوع ژنتیکی، وراثت‌پذیری و همبستگی بالا بین شاخص مورد نظر و پتانسیل عملکرد بیان نمود. بوسلاما و همکاران (۳) شاخص پایداری عملکرد (YSI) و گاویز و همکاران (۱۱) شاخص عملکرد (YI) را معرفی کردند. ابراهیمی و همکاران (۶) در تحقیق ارتباط بین صفات زراعی و نشانگرهای مولکولی در جو با استفاده از ۱۰ صفت زراعی و ۷۰ نشانگر مولکولی حاصل از ۱۰ جفت آغازگر ریزماهوره روی ۱۱۵ ژنوتیپ بومی جو مورد مطالعه قرار دادند. آغازگرهای HVM20, GMS003, Bamc0306 و HvHV A1 تغییرات بیشتری از صفات مورد بررسی را نشان دادند. مندولکانی و همکاران (۱) ارتباط بین ۶۸ ژنوتیپ بادام زمینی و ۱۳ جفت آغازگر ریزماهوره بررسی کردند، نتایج نشان داد بیشترین تغییرات مربوط به صفت طول دانه (۸۸ درصد) توسط نشانگرهای pPGPseq-PM3, PM36, PM50, PM183, PM210, 2D12B, Lec, A4-26, A4-4, Ah51 و Ah4 تبیین شدند. مجیدی و همکاران (۱۸) در پژوهشی ارتباط ۲۷ جفت آغازگر ریزماهوره با ۱۶ صفت مورفولوژیکی در ۳۶ نمونه از ۷ گونه جنس براسیکا توسط رگرسیون گام‌به‌گام مورد ارزیابی قرار دارند. مقدار قابل توجهی از تغییرات مورفولوژیکی توسط نشانگرهای BRMS-008, BRMS-024 می‌دهد احتمالاً ژن‌های مربوط به این صفات در مکان‌های کروموزومی نزدیک به هم قرار دارند. شکرپور و همکاران (۲۴) در بررسی رابطه بین نشانگرهای مورفولوژیکی، فیتوشیمیایی و مولکولی در گیاه مارتیغال (*Silybum marianum* L) مورد ارزیابی قرار دادند، نتایج نشان داد که بیش از ۴۰ درصد از تغییرات مربوط به وزن هزاردانه، ارتفاع بوته و تاریخ گلدهی توسط نشانگرهای مثبت شناسایی شده توجیه گردید. تاکنون هیچ‌گونه بررسی در مورد ارتباط بین نشانگرها و شاخص‌های تحمل به تنش انجام نشده است.

هدف از این تحقیق شناسایی نشانگرهای آگاهی‌بخش مرتبط با شاخص‌های تحمل به تنش خشکی در ۵۹ ژنوتیپ

جدول ۱- ژنوتیپ‌های مورد بررسی در آزمایش

Table 1. Evaluated genotypes in experiment

ژنوتیپ‌ها	منشاء	ژنوتیپ‌ها	منشاء	ژنوتیپ‌ها	منشاء	ژنوتیپ‌ها	منشاء
IR55419-04	فیلیپین (IRRI)	LINE 213	ایران	IR60080-42	فیلیپین (IRRI)	IR65907-116-1-B	فیلیپین (IRRI)
IR77298-5-6	فیلیپین (IRRI)	ANBARBO ILAM	ایران	SANGJO	ایران	IR65261-09-1-B	فیلیپین (IRRI)
IR60080-48	فیلیپین (IRRI)	IR66417-18-1-1-1	فیلیپین (IRRI)	USEN	فیلیپین (IRRI)	IR30	فیلیپین (IRRI)
IR68702-072-1-4-B	فیلیپین (IRRI)	CT6516-24-3-2	فیلیپین (IRRI)	IR67015-49-2-6	فیلیپین (IRRI)	IR62761-20	فیلیپین (IRRI)
Panda	هند	IR7471-199-1-302	فیلیپین (IRRI)	IRAT170	فیلیپین (IRRI)	IR55411-50A	فیلیپین (IRRI)
Way Rarem	ایتالیا	IRGC-15092RT-1031-62	فیلیپین (IRRI)	IR62752-07	فیلیپین (IRRI)	IRAT216	فیلیپین (IRRI)
IRFAON-308	فیلیپین (IRRI)	B6144F-MR-6-0-0	فیلیپین (IRRI)	Palawan	هند	SAMBA MAHSURI	هند
IR 53236-342	فیلیپین (IRRI)	IR69626B	فیلیپین (IRRI)	IR55423-01	فیلیپین (IRRI)	IR70358-84-1-1	فیلیپین (IRRI)
IR 47686-12-5-B-1	فیلیپین (IRRI)	WAB638-1	هند	CT6510-24-7-8	فیلیپین (IRRI)	CT6510-24-7-8	فیلیپین (IRRI)
IR66424-1-2-1-5	فیلیپین (IRRI)	IR60080-46A	فیلیپین (IRRI)	NONABOKA	هند	IR60080-46A	فیلیپین (IRRI)
IR57924-24	فیلیپین (IRRI)	Pegaso	ایتالیا	IR3441-97	فیلیپین (IRRI)	UPLRi-7	فیلیپین (IRRI)
Caiapo	ایتالیا	IR63371-38	فیلیپین (IRRI)	DAGADDESHI	هند	LINE226	ایران
IR63377-08	فیلیپین (IRRI)	CT13382-8-3-M	فیلیپین (IRRI)	IR63372-15	فیلیپین (IRRI)	LINE 835	ایران
CT6510-24-1-2	فیلیپین (IRRI)	IRAT177	فیلیپین (IRRI)	IR70360-38-1-B-1	فیلیپین (IRRI)	AUS196	فیلیپین (IRRI)
IR63380-08	فیلیپین (IRRI)	IR66421-062-1-1-2	فیلیپین (IRRI)	IRAT212	فیلیپین (IRRI)		

جدول ۲- مشخصات نمونه خاک مزرعه مورد آزمایش

Table 2. Soil characteristic for an experimental farm

مشخصات نمونه خاک	درصد اشباع (sp)	هدایت الکتریکی	PH	مواد خنثی شده (%)	کربن آلی (%)	ازت کل (%)	فسفر قابل جذب (ppm)	پتاسیم قابل جذب (ppm)	رس (%)	لائی (%)	ماسه (%)	نوع بافت خاک
۷۹/۹	۱۰/۵	۷/۹	۴	۲/۴۳	۰/۲۴	۹/۸	۲۹۵	۵۲	۳۶	۱۲	C	

۴- شاخص میانگین تولید MP:

$$MP = \frac{YS+YP}{2}$$

۵- شاخص میانگین هندسی (GMP):

$$GMP = \sqrt{Yp \cdot Ys}$$

۶- میانگین هامونیک (HM):

$$HM = 2(Yp \cdot Ys) / (Yp + Ys)$$

۷- شاخص پایداری عملکرد (YSI):

$$(YSI) = Ys / Yp$$

۸- شاخص عملکرد (YI):

$$(YI) = Ys / Ys$$

استخراج DNA و ارزیابی نشانگرهای مولکولی

ارزیابی ژنتیکی ۵۹ ژنوتیپ برنج با استفاده از ۱۰ نشانگر مولکولی (جدول ۳) بین ریز ماهواره‌ای ISSR و ۳۶ نشانگر ریزماهواره (جدول ۴) SSR در آزمایشگاه انجام گرفت.

اندازه‌گیری شاخص‌های حساسیت به تنش با استفاده از عملکرد ژنوتیپ‌های مورد بررسی در شرایط غرقاب و تنش براساس روابط پیشنهادی فیشر و مورر (۸)، روزیل وهامبلین (۲۰) و فرناندرز (۷) با استفاده از معادله‌های زیر محاسبه شدند:

۱- شاخص حساسیت به تنش (SSI):

$$SSI = \frac{1 - \frac{YS}{YP}}{SI} \quad SI = 1 - \frac{YS}{YP}$$

که در آن SI شدت تنش و YP, YS, YP, YS به ترتیب عملکرد و میانگین عملکرد ژنوتیپ‌ها در شرایط تنش و غرقاب هستند. شدت تنش با رابطه زیر محاسبه شد.

۲- شاخص تحمل (TOL):

$$TOL = YP - YS$$

در این فرمول YP و YS به ترتیب عملکرد ارقام در شرایط عادی و تنش خشکی می‌باشد

۳- شاخص تحمل به تنش (STI):

$$STI = \frac{Yp \cdot Ys}{(Yp)^2} (STI)$$

جدول ۳- نشانگرهای بین ریز ماهواره (ISSR) مورد بررسی در آزمایش

Table 3. Evaluated Inter Simple Sequence Repeat in experiment

نشانگرها	توالی آغازگر (۵-۳)	نشانگرها	دمای اتصال	توالی آغازگر (۵-۳)	نشانگرها
ISSR-1	(CAG) <sub>4</sub>	ISSR-6	۵۹/۱	(CAG) <sub>4</sub>	ISSR-1
ISSR-2	(GAAT) <sub>4</sub>	ISSR-7	۴۳/۸	(GAAT) <sub>4</sub>	ISSR-2
ISSR-3	(CCTA) <sub>4</sub>	ISSR-8	۴۸	(CCTA) <sub>4</sub>	ISSR-3
ISSR-4	(CT) <sub>8</sub> T	ISSR-9	۵۰	(CT) <sub>8</sub> T	ISSR-4
ISSR-5	(CCA) <sub>4</sub>	ISSR-10	۶۱/۱	(CCA) <sub>4</sub>	ISSR-5

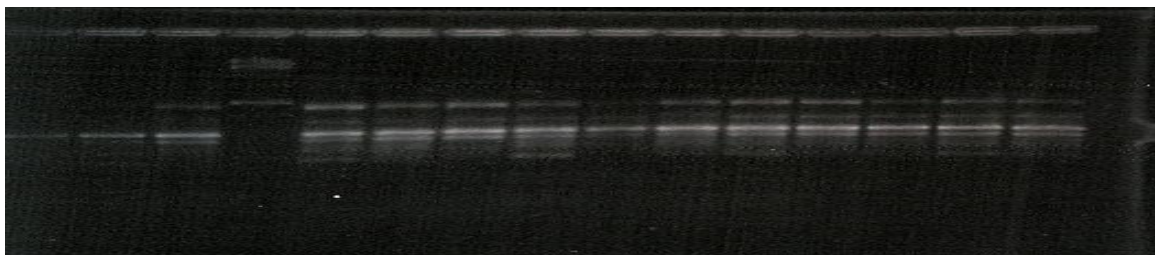
جدول ۴- نشانگرهای ریزماهواره (SSR) مورد بررسی در آزمایش

Table 4. Evaluated Simple Sequence Repeat in experiment

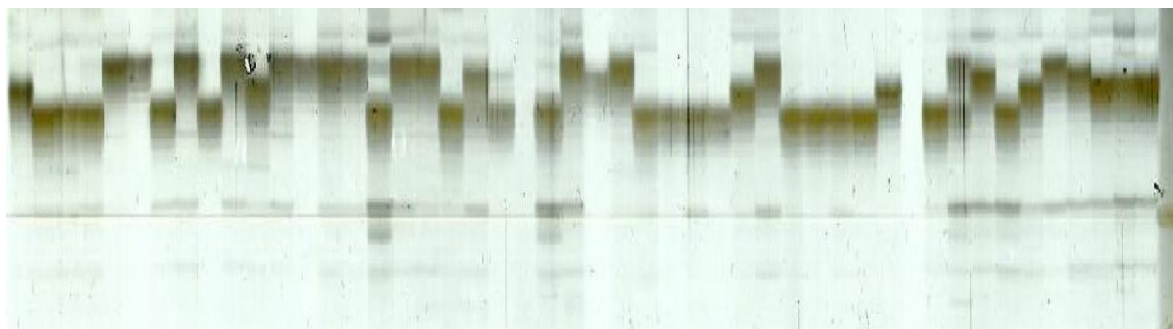
نشانگرها	آغازگر همسو	آغازگر معکوس
RM462	CCGCGAATCCATTTCAGACTGC	TCTAGGAGGAGATGGCGGAGTAGC
RM3148	GCITTTGGTATTTGCAGGTTTCACG	CTATTGCTCGAACACTTTGCTTCTCC
RM6324	CTGTACAAGAACGGCAGCAACC	GCACCACCAAACAGAGACAGAGG
RM6230	ATGCATGCAAGCGAATTTACC	GCCGTTCTTCGTGACGATGG
RM3294	CTCGTCTCCTCATGCATATCAGC	TGCCCTCGCTTGTCTTACTCC
RM5780	TGCCACAGAGTAGCATCAAACG	ACTAGCTGCTGCATCTTACTGTC
RM132	CTTTCTTCGCTACGCCTTCC	TCGACGAGGTTGATCAGTAGGG
RM523	TGAATTCCTGCACATGGTCAGC	TGGGAGGTTTGTAGGGTAATCC
RM5761	AAGATTACCCGGGATTGTAGTGG	AGTCTAGTCGCTCTTCCATAGG
RM8213	TGTTGGGTGGGTAAGTAGATGC	CCCAGTGATACAAAGATGAGTTGG
RM3658	GTAGCACTCCGCTGCTCGTCTCC	AATCCCACCCGCTCATCTCC
RM5424	TAAAGGTGTCCGACAAGAACACG	GATCGATCTGGAGGATTGAAAGG
RM3419	TGCTGCTATTCTCAAGACAAAACC	CTTGGTGAACAGTGTCTCTG
RM7118	CACGCGTAGCTAAGCATCAAGC	GATCAAAGATGCGTACGTTGG
RM5140	GGCACTCGTATTTCTCAACTTCTCC	GGGTGTATCAGGAGTACAGGTTGC
RM7420	CACAAAGCAAGCACCCAGAAGG	TCATGGCGTGAAGGAAGGAAGG
RM6773	GCTGCTCCACCTTCACTTCC	CGATGGTGTGTTGTTGGTTCG
RM549	ATCCCTGAACCCAAATTCTGTGCG	CTCTTTGATCTTCCGGTGATTTCG
RM427	TTGAGCTGATGAGAGTTGGTTGC	CTGTCACTAGCTCTGCCCTGACC
RM5711	GGACGGAAGGAATACGTTCTGATGG	CTGTCCATGCATCCATCTTACG
RM3583	ACCATGAGGTCCACTTGATACGC	GCCATGTATCATCTGATCTTCTCC
RM8005	CATTCCAGCGTGGATATTCG	CTTTGTCCATCTCGCGTACTCC
RM38	ACGAGCTCTCGATCAGCCTAGC	CACTCCATGGAAGAGGCAAGC
RM5647	GTTCCATCCAGACATTGTAGAAGC	TAAACTTGGTCTGTGACAGTGC
RM8206	AATCCACCTGGCCCTAATCTTCC	CACTGCTGCTTCTTCTCTGTC
RM7038	GATTAGAGCTTTGGTGGTCTTGG	ACTTGTGGTGGTCTGGTAGTCC
RM5652	CGCGTAGCTAAGCATCAA	TCAAAGATGCGTGTACGTT
RM474	TACACGAGGGAGTACTCGAATGG	CATGGAGGTATAGAAGAGCATGG
RM6179	GCGCCGCCGAGATGATAAGC	AGCGGCATCTCGTCCATCTCC
RM7545	GTTTCCATATCCGTGCTATTCCG	CACGATTCCTACAATACGAGAGC
RM441	AAGGGAGTAGCCTTCCATCTCC	GTGCTGACTCCTCTCCCTGTC
RM3625	TGCAATTTTCATCCACCCATCTCG	ACGAGTGCACGCTGTCAATTGG
RM7091	GCTGCAGATAGATGTGGATGGTATGG	AGATGCCATGTGGCGGTTTAGG
RM512	TGCAGTGAATGGAGACCCTAGC	CGGTGAGTCCATATCTTCAACC
RM6022	ATCAATCGCTCATCGAATCAGC	TCGACCTGGACTCCATTACTCG
RM519	AATTCCCGGAAATCAGCATCC	TCATCTGGACAGTTCGAGTACGC

سپس محصولات تکثیر یافته واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز با استفاده از ژل آگار ۱/۵ درصد با ولتاژ ۱۰۰ به مدت ۵۰ دقیقه الکتروفورز شد. ژل‌ها به مدت ۱۲ دقیقه در محلول اتیدیوم بروماید رنگ‌آمیزی شدند و توسط دستگاه عکس‌برداری از ژل (ژل داگ) قطعات تکثیر یافته DNA تحت نور فرابنفش مورد مشاهده قرار گرفتند. برای تکثیر نشانگرهای SSR واکنش PCR به روش Touchdown (۵) مورد مطالعه و ارزیابی قرار گرفت. جهت تفکیک محصولات PCR از الکتروفورز ژل پلی‌آکرآمید ۶ درصد و برای آشکارسازی الگوی نواریابی از روش رنگ‌آمیزی نیترات نقره استفاده شد. مقدار شاخص‌های تنش برای هریک از ژنوتیپ‌ها، همبستگی بین شاخص‌های عملکرد دانه در شرایط نرمال و تنش خشکی و رگرسیون گام‌به‌گام با استفاده از نرم‌افزارهای PAST و SPSS انجام گرفت.

استخراج برگ‌های جوان گیاهچه‌های ۲۱ روزه در مرحله چهار برگگی با استفاده از روش CTAB تغییر یافته (۱۳) انجام شد. برای تعیین کمیت و کیفیت DNA استخراجی از روش اسپکتروفتومتری و الکتروفورز آگار ۱ درصد استفاده شد. تکثیر قطعه DNA با واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل ۱۲/۵ میکرولیتر PCR Master، ۱۰ میکرولیتر  $dH_2O$ ، ۱ میکرولیتر DNA و ۱/۵ میکرولیتر از هر آغازگر به همراه یک قطره روغن مینرال برای جلوگیری از تبخیر انجام گرفت. برای تکثیر نشانگرهای ISSR واکنش PCR با دستگاه ترموسایکر با برنامه PCR شامل مراحل واسرشته‌سازی اولیه به مدت ۵ دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد در ادامه ۳۵ چرخه به صورت واسرشته‌سازی به مدت ۳۰ ثانیه در دمای ۹۴ سانتی‌گراد اتصال آغازگرها به مدت یک دقیقه در دمای مناسب اتصال برای هر آغازگر و مرحله توسعه رشته جدید به مدت ۱/۵ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد انجام گرفت.



شکل ۱- باندهای حاصل از نشانگر ISSR-9  
Figure 1. Bands of ISSR9 marker



شکل ۲- تصویر فرآورده PCR نمونه ۵۹ ژنوتیپ مورد بررسی بر روی ژل پلی آکریمید ۶ درصد (آغازگر RM3148)  
Figure 2. PCR product of 59 evaluated genotypes on polyacrilamid gel 6% (RM3148 marker)

CT6510-JR 55411-50,USEN ,JR65907-116-1-B  
JR66417-18-1-1-1 JR63380-08,24-1-2  
LINE226,IR 53236-342 ,JR66421-062-1-1-2  
JR70358-84-1-1,IR60080-48 ,CT6510-24-7-8  
IR66424-1-2-، CT6510-24-1-2,DAGADDESHI  
1-5 LINE 213,Way Rarem,Palawan, به عنوان  
ژنوتیپ‌های متحمل به تنش شناسایی شدند، میزان بالای  
عددی این شاخص‌ها نشان‌دهنده تحمل نسبی  
به تنش است. ژنوتیپ‌های IR66417-18-1-1-1 و  
IR68702-072-1-4-B در شرایط تنش دارای عملکرد نسبتاً  
یکسانی بودند ولی به دلیل بالا بودن عملکرد  
IR68702-072-1-4-B در شرایط غرقاب، شاخص (MP)  
آن بالاتر شد. می‌توان چنین نتیجه گرفت که این شاخص  
زمانی قابل اعتماد است که با عملکرد بالا در شرایط تنش در  
نظر گرفته شود. به‌طور کلی عکس العمل گیاهان زراعی و  
ارزیابی آنها برای حداکثر عملکرد در شرایط محیطی متنوع  
وابسته به توانایی متفاوت آنها در استفاده از شرایط محیطی  
است. این امر از طریق تنظیم اجزای عملکرد و اثرات متقابل  
ژنوتیپ‌ها به هنگام بروز شرایط نامطلوب و مطلوب امکانپذیر  
است. از لحاظ شاخص حساسیت به تنش SSI مقادیر عددی  
پایین نشان‌دهنده تحمل بالای ژنوتیپ‌ها و مقادیر بالا  
نشان‌دهنده حساسیت ژنوتیپ‌ها به تنش خشکی است. ارزیابی  
ژنوتیپ‌ها با استفاده از شاخص حساسیت محیطی (SSI)، مواد  
آزمایشی را صرفاً براساس مقاومت و حساسیت به تنش دسته  
بندی می‌کند به عبارت دیگر با استفاده از این شاخص می‌توان  
ژنوتیپ‌های حساس و متحمل را بدون توجه به پتانسیل  
عملکرد آنها مشخص کرد (۸). این شاخص به‌منظور یافتن  
ژنوتیپ‌های متحمل کارایی بالایی دارد. در واقع در شاخص

## نتایج و بحث

ژنوتیپ‌های مورد بررسی براساس ۱۰ نشانگر بین  
ریزماهواره در مجموع ۱۴۴ باند با میانگین ۱۴/۴ باند به ازای  
هر جایگاه نشانگری ایجاد نمود و از ۱۴۴ باند تشکیل شده  
۶۹/۱۷ درصد از باندها چندشکل بودند. پنجاه و نو ژنوتیپ  
مورد بررسی براساس ۳۶ نشانگر ریزماهواره SSR در مجموع  
۱۸۹ آلل با میانگین ۵/۲۵ آلل به ازای هر جایگاه نشانگری  
ایجاد نمود. به‌منظور سنجش حساسیت یا تحمل ژنوتیپ‌های  
مورد بررسی در این آزمایش به تنش رطوبتی از شاخص‌ها  
تنش (SSI)، شاخص تحمل به تنش (STI)، شاخص میانگین  
تولید (MP)، میانگین هندسی (GMP)، میانگین هارمونیک  
(HM)، شاخص پایداری عملکرد (YSI) و شاخص عملکرد  
(YI) استفاده شد. شاخص‌های (GMP) و (STI) به ترتیب  
ژنوتیپ‌های IR68702-072-1-4-، JRAT216، Caiapo،  
IR63380-، JR 55411-50، Pegaso، JR60080-46A، B،  
JR66421-062-1-1-2 JR70360-38-1-B-1,08  
IR65907-116-1-B را به‌عنوان ژنوتیپ‌های متحمل به  
تنش شناسایی شدند، میزان بالای عددی این شاخص‌ها  
نشان‌دهنده تحمل نسبی به تنش است (جدول ۷). براساس  
شاخص (HM) از بین ۵۹ ژنوتیپ مورد بررسی به ترتیب  
IR66421-062-1-1-2، JR70358-84-1-1-1،  
JR66421-062-1-1-2، USEN، Pegaso، JRAT216  
IR، JR68702-072-1-4-B، JR63380-08، LINE226  
DAGADDESHI، JR70360-38-1-B-1، 55411-50  
را به‌عنوان ژنوتیپ‌های متحمل به تنش شناسایی شدند، میزان  
بالای عددی این شاخص‌ها نشان‌دهنده تحمل نسبی به تنش  
است. شاخص (MP) به ترتیب ژنوتیپ‌های Caiapo،  
JR60080-46A، JR68702-072-1-4-B، JRAT216

متحمل به تنش شناسایی شدند، میزان بالای عددی این شاخص‌ها نشان‌دهنده تحمل نسبی به تنش است (جدول ۷). براساس شاخص مورد بررسی در این آزمایش می‌توان ژنوتیپ‌های IR68702-072-1-4-B, Pegaso, Caiapo, IR55411-50 را به‌عنوان ژنوتیپ‌های متحمل به تنش معرفی کرد. همبستگی بین شاخص‌ها تحمل به خشکی و عملکرد می‌تواند به‌عنوان معیاری مناسب برای بهترین ژنوتیپ‌ها و شاخص‌ها به کار رود. نتایج ضرایب همبستگی شاخص‌های مقاومت نشان داد که همبستگی عملکرد در شرایط غرقاب به ترتیب با شاخص‌های (SSI)، (TOL)، (STI)، (MP)، (GMP)، (HM) و (YI) معنی‌دار بود که بیشترین آن مربوط به همبستگی با شاخص حساسیت به تنش ( $r=0.74^{**}$ ) بود و در شرایط تنش نیز شاخص‌های همبستگی بالایی با عملکرد نشان دادند که بیشترین آن مربوط به شاخص عملکرد ( $r=0.99^{**}$ ) بود (جدول ۸). به‌طورکلی شاخص‌های که در هر دو محیط دارای همبستگی بالایی با عملکرد دانه باشند می‌توانند به‌عنوان شاخص‌ها مناسب معرفی شوند، چرا که این شاخص‌ها قادر به جدا کردن و شناسایی ژنوتیپ‌های با عملکرد دانه بالا در هر دو محیط می‌باشند (۷). در همین رابطه با توجه به نتایج ضرایب همبستگی شاخص‌های مختلف و عملکرد تحت شرایط تنش و بدون تنش، می‌توان شاخص‌های SSI، STI، MP، GMP، HM و YI را به‌عنوان شاخص‌های برتر در هر دو شرایط غرقاب و تنش خشکی، قادرند ژنوتیپ‌های مقاوم با عملکرد بالا را نشان دهند. ژنوتیپ‌های IR60080-46A، IR55411-50، IR70358-84-1، IR68702-072-1-4-B، IR66421-062-1-1-2، IR63380-08، IR66421-062-1-1-2، IR68702-072-1-4-B براساس شاخص‌های مذکور در رده بالایی قرار داشتند و با توجه به این که این شاخص‌ها به‌عنوان برترین شاخص‌ها در این تحقیق شناخته شدند، می‌توان این ژنوتیپ‌ها را به‌عنوان متحمل‌ترین ژنوتیپ‌ها و ژنوتیپ‌های IR60080-42، IR62761-20، CT13382-8، IR60080-42، UPLRi-7، IRAT177، 3-M، LINE 835 که کمترین مقدار این شاخص‌ها را داشتند به‌عنوان حساسترین ژنوتیپ‌ها در این تحقیق معرفی کرد. عملکرد دانه تحت شرایط تنش با شاخص تحمل (TOL) همبستگی منفی و معنی‌داری در سطح ۱ درصد داشت، بنابراین با افزایش عملکرد در شرایط تنش میزان این شاخص کاهش می‌یابد. فرشادفر و همکاران (۱۰) در مطالعه روی نخود همبستگی تمام شاخص‌ها را با عملکرد در شرایط غیر تنش مثبت و معنی‌دار و همبستگی شاخص (TOL) را با عملکرد در شرایط تنش منفی گزارش کردند.

(SSI) تغییر یا آسیب وارده به ژنوتیپ‌ها در شرایط تنش مدنظر قرار می‌گیرد. به این معنی که اگر ژنوتیپی در هر دو شرایط تنش و بدون تنش دارای عملکرد بالاتری باشد اما درصد تغییرات زیادی را نشان دهد به‌عنوان ژنوتیپ متحمل شناسایی نمی‌شود. ژنوتیپ‌های IRAT216، Caiapo و Pegaso از لحاظ شاخص MP به‌عنوان شاخص مناسب شناخته شدند در حالی که از لحاظ شاخص SSI به‌عنوان ژنوتیپ‌های حساس شناخته شدند که نشان‌دهنده این است که این ژنوتیپ‌ها دارای میانگین عملکرد بالا بودند ولی درصد تغییرات زیادی را نشان داده‌اند و به‌عنوان ژنوتیپ‌های متحمل شناسایی نشدند. از لحاظ شاخص تحمل (TOL) ژنوتیپ‌هایی که کمترین مقدار را نشان بدهند به‌عنوان متحمل‌ترین ژنوتیپ‌ها شناخته می‌شوند. به ترتیب ژنوتیپ‌های AUS196، IR7471-199-1-302، NONABOKA، IR63372-15، IR77298-5-6، IRFAON-308، IR55423-01، IR47686-12-5-B-1، IR65261-09-1-B، CT6510-24-1-2 بیشترین مقدار شاخص تحمل را به خود اختصاص دادند. با بررسی عملکرد ژنوتیپ‌ها در هر دو شرایط تنش و بدون تنش مشخص شد که شاخص تحمل (TOL) در گزینش ژنوتیپ‌های که در هر دو محیط تنش و بدون تنش دارای عملکرد مناسب باشند، موفق نبود. در واقع شاخص تحمل، (TOL) به نوعی تغییر حاصل از شرایط تنش را بیان می‌کند. یعنی ژنوتیپ‌هایی که دارای شاخص تحمل پایینی هستند تغییرات کمتری نشان می‌دهند و برعکس پایین بودن درصد تغییرات به عنوان یک فاکتور تحمل به تنش، بیشتر ارزش فیزیولوژیک دارد تا زراعی، انتخاب بر اساس شاخص تحمل (TOL) باعث گزینش ژنوتیپ‌های با عملکرد به نسبت پایین در محیط عادی و عملکرد پایین در شرایط تنش می‌گردد، که چنین ژنوتیپ‌هایی از نظر شناسایی و همکاران (۲۳) به علت پایین بودن عملکرد از نظر زراعی مناسب نیستند. در نتیجه پایین بودن شاخص تحمل الزاماً به معنی بالا بودن عملکرد در شرایط بدون تنش نیست، بلکه ممکن است عملکرد یک ژنوتیپ در شرایط بدون تنش پایین باشد و در شرایط تنش نیز با افت کمتری همراه باشد که این باعث کوچک ماندن شاخص تحمل به تنش شود و در نتیجه این ژنوتیپ به عنوان ژنوتیپ متحمل معرفی گردد (۱۷). به‌عنوان مثال ژنوتیپ‌های، IRAT177، LINE 835، UPLRi-7، IRAT212، که در هر دو شرایط دارای عملکرد نسبتاً کمی نسبت به دیگر ژنوتیپ‌ها بودند. اما به دلیل افت اندک عملکرد در شرایط تنش بر اساس، این شاخص به‌عنوان ژنوتیپ متحمل شناسایی شد، در حالی که شاخص حساسیت به تنش این ژنوتیپ‌ها را ژنوتیپ‌های حساس معرفی کرده‌است. شاخص‌های (YSI) و (YI) به ترتیب ژنوتیپ‌های Caiapo، IR47686-12-5-B-1، Panda، Pegaso، DAGADDESHI، LINE226، IR63380-08، CT6510-24-7-8 به‌عنوان ژنوتیپ‌های

جدول ۷- برآورد شاخص‌های مقاومت به خشکی ژنوتیپ‌های مورد مطالعه بر اساس عملکرد در شرایط نرمال و تنش خشکی

Table 7. Estimate of drought tolerance indices for rice genotypes based on yields in normal and stress conditions

ارقام	YP	YS	STI	MP	SSI	TOL	GMP	HM	YSI	YI
IR67015-49-2-6	۵/۱۴	۲/۱۳	-/۳۴۶	۳/۶۳۵	۳/۶۳	۳/۰۱	۳/۳۰	۳/۰۱	-/۴۱۴	۱/۰۵
IR 47686-12-5-B-1	۵/۰۹	۲/۴۸	-/۴۰۰	۳/۷۸۵	۴/۴۹	۲/۶۱	۳/۵۵	۳/۳۳	-/۴۸۸	۱/۲۲
Panda	۵/۰۷	۲/۴۶	-/۳۹۵	۳/۷۶۵	۴/۴۴	۲/۶۱	۳/۵۳	۳/۳۱	-/۴۸۵	۱/۲۱
Way Rarem	۵/۶۶	۲/۳۵	-/۴۲۱	۴/۰۰۵	۴/۱۷	۳/۳۱	۳/۶۰	۳/۲۲	-/۴۱۵	۱/۱۶
IRFAON-308	۵/۲	۲/۳۱	-/۳۸۰	۳/۷۵۵	۴/۰۷	۲/۸۹	۳/۴۶	۳/۱۹	-/۴۴۵	۱/۱۴
IR66421-062-1-1-2	۶/۰۶	۲/۶۵	-/۵۰۸	۴/۳۵۵	۴/۹۰	۳/۴۱	۴	۳/۶۸	-/۴۴۷	۱/۳۰
IR66417-18-1-1-1	۶/۳۵	۲/۳۷	-/۴۷۶	۴/۳۶۰	۴/۲۲	۳/۹۸	۳/۸۷	۳/۴۵	-/۳۷۳	۱/۱۶
IR 53236-342	۶/۴۳	۲/۲۷	-/۴۶۱	۴/۳۵۰	۳/۹۷	۴/۱۴	۳/۸۱	۳/۳۵	-/۳۵۲	۱/۱۱
Caiapo	۷/۲۹	۲/۷۴	-/۶۳۱	۵/۰۱۵	۵/۱۲	۴/۵۵	۴/۴۶	۳/۹۸	-/۳۷۶	۱/۳۵
IR68702-072-1-4-B	۷/۲۰	۲/۳۸	-/۵۴۱	۴/۷۹۰	۴/۲۴	۴/۸۲	۴/۱۳	۳/۵۷	-/۳۳۰	۱/۱۷
IR65907-116-1-B	۶/۸۸	۲/۲۸	-/۴۹۶	۴/۵۸۰	۴	۴/۶۰	۳/۹۵	۳/۴۲	-/۳۳۱	۱/۱۲
IR55419-04	۶/۳۳	۱/۵۲	-/۳۰۴	۳/۹۲۵	۲/۱۴	۴/۸۱	۳/۱	۲/۴۵	-/۲۴۰	-/۷۵
Palawan	۵/۸۷	۲/۱۵	-/۳۹۹	۴/۰۱۰	۳/۶۳	۳/۷۳	۳/۵۵	۳/۱۴	-/۳۶۶	۱/۰۵
IR3441-97	۴/۶۵	۱/۵۶	-/۲۲۹	۳/۱۰۵	۲/۲۴	۳/۰۹	۲/۶۹	۲/۳۳	-/۳۲۴	-/۷۶
IR70360-38-1-B-1	۶/۵۶	۲/۴۵	-/۵۰۸	۴/۵۰۵	۴/۴۱	۴/۱۱	۴/۰۱	۳/۵۶	-/۳۷۳	۱/۲۰
IR60080-42	۵/۳۸	۱/۰۶	-/۱۸۰	۳/۲۲۰	۱/۰۲	۴/۳۲	۲/۳۸	۱/۷۷	-/۱۹۶	-/۵۲
IR77298-5-6	۴/۹۳	۲/۱۲	-/۳۳۵	۳/۵۲۵	۳/۶۱	۲/۸۱	۳/۶۶	۲/۹۶	-/۴۴۵	۱/۰۶
IR60080-48	۶/۱۵	۲/۳۲	-/۴۵۱	۴/۲۳۵	۴/۱	۳/۸۳	۳/۷۸	۳/۳۶	-/۳۷۷	۱/۱۴
IRAT170	۶/۱۲	۱/۷۸	-/۳۴۳	۳/۹۵۰	۲/۷۸	۴/۳۴	۳/۳۰	۲/۷۵	-/۲۹۱	-/۸۸
سنگ جو	۵/۴۱	۲/۰۶	-/۳۵۲	۴/۷۳۵	۳/۴۶	۳/۳۵	۳/۳۴	۲/۹۸	-/۳۸۰	۱/۰۱
USEN	۶/۵۳	۲/۵۹	-/۵۳۴	۴/۵۶۰	۴/۷۶	۳/۹۴	۴/۱۱	۳/۷۰	-/۳۹۶	۱/۲۷
IR30	۵/۲۴	۱/۹۵	-/۳۲۴	۴/۵۹۵	۳/۱۹	۳/۲۹	۳/۲۰	۲/۸۴	-/۳۷۳	-/۸۱
IR62752-07	۵/۲۹	۱/۴۴	-/۲۴۱	۳/۳۶۵	۱/۹۵	۳/۸۵	۲/۷۶	۲/۲۶	-/۲۷۳	-/۷۱
IR62761-20	۵/۱۲	۰/۹۷	-/۱۵۷	۳/۰۴۶	۰/۸۱	۴/۱۴	۲/۳۳	۱/۶۳	-/۱۹۰	-/۴۸
NONABOKA	۴/۸۵	۱/۹۶	-/۳۰۰	۳/۴۰۵	۳/۲۲	۲/۸۹	۳/۰۸	۲/۷۹	-/۴۰۴	-/۹۶
CT6510-24-1-2	۵/۸۹	۲/۲۹	-/۴۲۶	۴/۰۹۰	۴/۰۲	۳/۶۰	۳/۶۷	۳/۲۹	-/۳۸۸	۱/۱۲
IR7471-199-1-302	۵/۲۷	۲/۳۵	-/۳۹۱	۳/۸۱۰	۴/۱۷	۲/۹۲	۳/۵۲	۲/۷۰	-/۴۴۵	۱/۱۵
IR69626B	۵/۰۶	۱/۸۵	-/۲۹۶	۳/۴۵۵	۲/۹۵	۳/۲۱	۳/۰۶	۲/۷۰	-/۳۶۶	-/۹۱
عنبر بوی ایلام	۵/۱۵	۱/۸۸	-/۳۰۵	۳/۵۱۵	۳/۰۲	۳/۲۷	۳/۱۱	۲/۷۵	-/۳۶۶	-/۹۲
IR63371-38	۵/۳۱	۱/۸۵	-/۳۱۰	۳/۵۸۰	۲/۹۵	۳/۴۶	۳/۱۳	۲/۷۴	-/۳۴۷	-/۹۱
IR63372-15	۴/۷۷	۲/۱۴	-/۳۲۳	۳/۴۵۵	۳/۶۶	۲/۶۳	۳/۲	۲/۹۵	-/۴۸۸	۱/۰۵
IR63377-08	۵/۲۹	۱/۵۸	-/۲۶۴	۳/۴۳۵	۲/۲۹	۳/۷۱	۲/۸۹	۲/۴۳	-/۲۹۸	-/۷۸
IR55423-01	۴/۵۳	۱/۹۵	-/۲۸۰	۳/۲۴۰	۳/۱۹	۲/۵۸	۲/۹۷	۲/۷۶	-/۴۳۱	-/۹۶
IR63380-08	۶/۵۰	۲/۴۷	-/۵۰۸	۴/۴۷۵	۴/۴۶	۴/۰۳	۴/۰۱	۳/۵۷	-/۳۸۰	۱/۲۲
B6144F-MR-6-0-0	۴/۳۵	۰/۸۱	-/۱۱۱	۲/۵۸۱	۰/۴۱	۳/۵۳	۱/۸۸	۱/۳۶	-/۱۸۶	-/۴۰
CT6510-24-1-2	۴/۱۳	۲/۱۰	-/۲۷۴	۳/۱۵۵	۳/۵۶	۲/۰۳	۲/۹۵	۲/۷۸	-/۵۰۹	۱/۰۳
AUS196	۴/۲۰	۲/۲۸	-/۳۷۵	۳/۷۴۰	۴	۲/۹۲	۳/۴۴	۳/۱۷	-/۴۳۸	۱/۱۲
IR57924-24	۵/۴۸	۲/۰۹	-/۳۶۳	۳/۷۸۵	۳/۵۴	۳/۲۹	۳/۳۹	۳/۰۲	-/۳۸۲	۱/۰۳
IR66424-1-2-1-5	۵/۵۹	۲/۴۴	-/۴۳۲	۴/۰۱۵	۴/۳۹	۳/۱۵	۳/۷۰	۳/۳۹	-/۴۳۷	۱/۲۰
CT6516-24-3-2	۵/۳۰	۱/۵۳	-/۲۵۶	۳/۴۱۵	۲/۱۷	۳/۷۷	۲/۸۵	۲/۳۷	-/۲۸۹	-/۷۵
CT13377-4-2-M	۵/۵۸	۲/۲۲	-/۳۹۲	۳/۹۰۰	۳/۸۵	۳/۳۶	۳/۵۲	۳/۱۷	-/۳۹۴	۱/۰۹
IR65261-09-1-B	۴/۱۹	۲/۱۷	-/۳۷۸	۳/۱۸۰	۳/۷۳	۲/۰۲	۳/۰۱	۲/۸۵	-/۵۱۸	۱/۰۷
CT13382-8-3-M	۴/۸۱	۰/۸۶	-/۱۳۰	۲/۸۳۵	-/۵۳	۳/۹۵	۲/۰۳	۱/۴۵	-/۱۷۸	-/۴۲
IRAT177	۴/۹۰	۰/۹۹	-/۱۵۳	۲/۹۴۷	۰/۸۶	۳/۹۰	۲/۲۰	۱/۶۵	-/۲۰۲	-/۴۹
WAB638-1	۵/۲۸	۱/۸۵	-/۳۱۰	۳/۵۶۵	۲/۹۵	۳/۴۳	۳/۱۳	۲/۷۳	-/۳۵۱	-/۹۱
IR60080-46A	۶/۷۱	۲/۵۳	-/۵۳۶	۴/۶۲۰	۴/۶۱	۴/۱۸	۴/۱۲	۳/۶۷	-/۳۷۶	۱/۲۴
Pegaso	۶/۰۷	۲/۶۷	-/۵۱۳	۴/۳۷۰	۴/۹۵	۳/۴۰	۴/۰۲	۳/۷۰	-/۴۴۱	۱/۳۲
IRAT212	۵/۶۸	۰/۹۶	-/۱۷۲	۳/۳۲۰	۰/۷۸	۴/۷۱	۲/۳۳	۱/۶۴	-/۱۶۹	-/۴۷
LINE 213	۵/۶۷	۲/۳۴	-/۴۲۰	۴/۰۰۵	۴/۱۵	۳/۳۳	۳/۶۴	۳/۳۱	-/۴۱۳	۱/۱۵
IR 55411-50	۶/۵۷	۲/۴۵	-/۵۰۸	۴/۴۱۰	۴/۴۱	۴/۱۲	۴/۰۱	۳/۵۶	-/۳۷۳	۱/۲۰
IRAT216	۷/۰۸	۲/۶۷	-/۵۹۹	۴/۸۵۵	۴/۹۵	۴/۴۱	۴/۳۵	۳/۸۷	-/۳۷۷	۱/۳۱
IRGC-15092RT-1031-62	۵/۰۷	۲/۳۵	-/۳۷۵	۳/۷۱۰	۴/۱۷	۲/۷۲	۳/۴۵	۳/۲۱	-/۴۶۳	۱/۱۶
IR70358-84-1-1	۶/۳۰	۲/۰۸	-/۴۰۷	۴/۱۴۰	۳/۵۱	۴/۱۲	۳/۵۹	۳/۱۱	-/۳۳۵	۱/۰۲
CT6510-24-7-8	۶/۱۵	۲/۴۹	-/۴۷۷	۴/۳۲۰	۴/۵۱	۳/۶۶	۳/۸۹	۳/۵۴	-/۳۹۹	۱/۲۱
DAGADDESHI	۵/۷۵	۲/۵۳	-/۴۶۰	۴/۴۲۰	۴/۶۱	۳/۲۲	۳/۸۱	۳/۵۱	-/۴۴۰	۱/۲۴
SAMBA MAHSURI	۵/۹۹	۱/۹۸	-/۳۷۴	۳/۹۸۵	۳/۲۷	۴/۰۱	۳/۴۴	۲/۹۷	-/۳۳۰	-/۹۷
UPLRi-7	۵/۵۹	۰/۸۳	-/۱۴۸	۳/۲۱۴	۰/۴۸	۴/۷۵	۲/۱۶	۱/۴۵	-/۱۴۹	-/۴۱
LINE226	۶/۰۷	۲/۶۳	-/۴۶۱	۴/۳۵۰	۴/۸۵	۳/۴۴	۴	۳/۶۶	-/۴۴۴	۱/۲۹
LINE 835	۵/۸۲	۰/۸۷	-/۱۶۰	۳/۳۴۶	۰/۵۶	۴/۹۴	۲/۲۵	۱/۵۱	-/۱۵۰	-/۴۳

جدول ۸- ماتریس ضرایب همبستگی بین عملکرد در شرایط تنش و غرقاب و شاخص‌های تحمل  
Table 8. Correlation coefficient matrix between yield and tolerance indices under flooding and stress conditions

YI	YSI	HM	GMP	TOL	SSI	MP	STI	YS	YP	
۰/۴۴۷**	-۰/۰۸۱	۰/۵۶۴**	۰/۷۰۰**	۰/۷۱۹**	۰/۴۴۶**	۰/۸۹۷**	۰/۷۴۶**	۰/۴۴۶**	۱	YP
۰/۹۹۷**	۰/۸۴۸**	۰/۹۸۳**	۰/۹۴۹**	-۰/۳۰۱*	۰/۹۶۶**	۰/۷۹۶**	۰/۹۲۳**	۱		YS
۰/۹۲۱**	۰/۵۸۵**	۰/۹۶۱**	۰/۹۹۳**	۰/۰۷۸	۰/۹۲۳**	۰/۹۶۰**	۱			STI
۰/۷۹۵**	۰/۳۶۴**	۰/۸۶۷**	۰/۹۴۳**	۰/۳۳۸*	۰/۷۹۵**	۱				MP
۰/۹۹۷**	۰/۸۴۸**	۰/۹۸۳**	۰/۹۴۹**	-۰/۳۰۱*	۱					SSI
-۰/۲۹۸*	-۰/۷۴۵**	-۰/۱۶۱	۰/۰۰۹	۱						TOL
۰/۹۴۷**	۰/۶۴۵**	۰/۹۸۰**	۱							GMP
۰/۹۷۹**	۰/۷۶۰**	۱								HM
۰/۸۴۵**	۱									YSI
۱										YI

\* و \*\*: به ترتیب معنی‌دار در سطح ۵ و ۱ درصد

RM462-B, RM549-E, RM8206-C, RM7118-B, RM5424-D, RM3294-B, RM6324-B, RM5780-G تبیین شد. بیشترین توجیه تغییرات بر اساس داده‌های بین ریزماهواره مربوط به شاخص عملکرد (YI) با ۰/۴۶۹ توسط مکان‌های ژنی ISSR3-1, ISSR10-8, ISSR10-10 مکان‌های ژنی ISSR1-6, ISSR2-8, ISSR91- شرفی (۱۸) در تجزیه ارتباطی صفات مورفولوژیک با نشانگرهای ریز ماهواره در گونه‌های جنس براسیکا به این نتیجه رسیدند که مکان ژنی BRMS- 008 بیشترین درصد از تغییرات صفات روز تا گلدهی (۰/۵۱) تعداد شاخه فرعی (۰/۵۶) را توجیه می‌نمایند. مکان ژنی NA12-AO2 دارای بیشترین  $R^2$  با مقدار ۰/۵۹ بود که صفت روز تا رسیدگی را توجیه کرد. ابراهیمی و همکاران (۶) تجزیه ارتباطی ۱۱ صفات زراعی با ۷۰ نشانگر ریزماهواره در جوهای بومی بررسی کردند. بیشترین تعداد نشانگر برای صفت تعداد گره و کمترین آن مربوط تعداد برگ و طول ریشه‌چه شناسایی شد. همچنین بیشترین و کمترین  $R^2$  کل به ترتیب مربوط به صفت عرض دانه و بیرون زدگی ریشه‌چه بود. همچنین بیشترین و کمترین  $R^2_{max}$  به ترتیب مربوط صفات ارتفاع و بیرون زدگی ریشه‌چه بود. در مجموع، به نظر می‌رسد که نشان‌گرهایی مورد مطالعه توانسته‌اند ژنوتیپ‌های حساس‌تر به تنش خشکی را از بقیه ژنوتیپ‌ها تفکیک کنند. در نتیجه به نظر می‌رسد که از این نشانگرها می‌توان برای غربال اولیه ژنوتیپ‌ها و تمایز ژنوتیپ‌های بسیار حساس از بقیه استفاده کرد. نشانگرهای SSR و ISSR ابزار مناسبی برای تفکیک و شناسایی ارقام و ژنوتیپ‌های مختلف برنج می‌باشند. از نتایج این تحقیق می‌توان در راستای برنامه‌ریزی اصلاحی به منظور ایجاد جمعیت‌های متنوع‌تر برای صفات و جایگاه‌های مختلف کروموزومی مد نظر قرار گیرد.

نورمند موئید و همکاران (۱۹) نیز در گندم همبستگی GMP و STI را با عملکرد مثبت و معنی‌دار گزارش کردند رابطه بین داده‌های مولکولی و شاخص‌های مورد مطالعه با استفاده از رگرسیون چندگانه بررسی شد بدین ترتیب هر شاخص تحمل به تنش به‌عنوان متغیره وابسته و نشانگرهای ریزماهواره و بین ریزماهواره به‌عنوان متغیرهای مستقل در نظر گرفته شدند. نتایج رگرسیون چندگانه برای هر یک از ۱۰ شاخص‌های و ۱۸۹ مکان ژنی ریزماهواره و ۱۴۴ مکان ژنی بین ریزماهواره در جدول‌های ۹ و ۱۰ آمده است. براساس تجزیه رگرسیون داده‌های مولکولی ریزماهواره و بین ریزماهواره با شاخص‌های، در مجموع به ترتیب ۵۷ و ۴۴ نشانگر آگاهی بخش با شاخص‌های شناسایی شد. براساس تجزیه رگرسیون داده‌های ریزماهواره شاخص تحمل به تنش (STI) و شاخص میانگین هندسی (GMP) به ترتیب با ۹ و ۳ نشانگر بیشترین و کمترین تعداد نشانگرهای آگاهی‌بخش را نشان دادند. نتایج رگرسیون داده‌های بین ریزماهواره نشان داد که عملکرد در شرایط تنش (YS)، شاخص حساسیت به تنش (SSI)، میانگین هارمونیک (HM) و شاخص عملکرد (YI) با ۶ نشانگر بیشترین و شاخص پایداری عملکرد (YSI) و شاخص تحمل (TOL) با ۲ نشانگر کمترین تعداد نشانگرهای آگاهی‌بخش را نشان دادند.

براساس داده‌های ریزماهواره شاخص پایداری عملکرد (YSI) با ۰/۲۱۱ بیشترین  $R^2_{max}$  و عملکرد در شرایط نرمال (YP) با ۰/۰۹۰ کمترین  $R^2_{max}$  و براساس داده‌های بین ریزماهواره شاخص پایداری عملکرد (YSI) با ۰/۲۲۹ بیشترین  $R^2_{max}$  و شاخص تحمل به تنش (STI) با ۰/۰۹۸ کمترین  $R^2_{max}$  را به خود اختصاص دادند. بیشترین توجیه تغییرات بر اساس داده‌های ریزماهواره مربوط به شاخص تحمل به تنش (STI) با ۰/۵۴۱ توسط مکان‌های ژنی RM5424-E,

جدول ۹- نتایج تجزیه ارتباطی با استفاده از رگرسیون گام‌به‌گام برای شاخص‌های تحمل به تنش و داده های مولکولی ریزماهواره در ژنوتیپ‌های مختلف برنج

Table 9. Result of association analysis using step by stepwise regression between tolerance indices and molecular SSR data

R <sup>2</sup> <sub>max</sub>	خطایی معیار	سطح معنی‌داری	ضریب رگرسیون استاندارد شده	نشانه‌گرهای آگاهی بخش	شاخص‌های تنش	R <sup>2</sup> <sub>max</sub>	خطایی معیار	سطح معنی‌داری	ضریب رگرسیون استاندارد شده	نشانه‌گرهای آگاهی بخش	شاخص‌های تنش
۱۱	۰/۱۷۰	۰/۰۰۲	۰/۰۵۶	RM3294-B			۲۵۲/۸۰۸	۰/۰۰۱	۰/۸۷۶/۰۳۰	RM512-C	
۰/۴	۰/۲۷۲	۰/۰۰۴	۰/۸۲۶	RM5424-D	GMP	۰/۰۹۶	۲۱۱/۲۵۰	۰/۰۰۰	۰/۱۰۲۸/۴۴۱	RM512-D	YP
	۰/۵۳۰	۰/۰۰۹	۰/۲۸۳	RM6230-D			۳۲۲/۹۳۹	۰/۰۰۰	۰/۱۲۱/۹۱۷	RM5780-B	
	۰/۱۴۱	۰/۰۰۶	۰/۴۰۸	RM8005-C			۱۵۴/۱۳۰	۰/۰۰۹	۰/۴۱۵/۱۴۶	RM7038-A	
	۰/۳۴۷	۰/۰۰۰	۰/۹۳۷	RM3658-F			۰/۱۰۱	۰/۰۰۸	۰/۲۸۰	RM8005-C	
۱۱	۰/۳۱۵	۰/۰۰۲	۰/۷۰۵	RM5870-B		۰/۱۵۳	۰/۱۸۵	۰/۰۰۱	۰/۰۶۴۲	RM3658-F	
۰/۰	۰/۱۶۵	۰/۰۰۲	۰/۶۴۱	RM519-D	HM		۰/۳۷۷	۰/۰۰۴	۰/۱۱۴۷	RM6230-D	
	۰/۱۵۸	۰/۰۰۷	۰/۴۴۴	RM3625-E			۰/۱۱۲	۰/۰۰۰	۰/۴۲۶	RM3625-E	YS
	۰/۵۳۲	۰/۰۰۵	۰/۳۰۸	RM518-A			۰/۱۴۲	۰/۰۰۱	۰/۵۲۹	RM519-D	
	۰/۰۱۸	۰/۰۰۰	۰/۰۸۱	RM8005-C			۰/۱۹۳	۰/۰۱۰	۰/۵۱۶	RM5761-B	
۲۱	۰/۰۳۲	۰/۰۰۱	۰/۱۱۵	RM3658-F	YSI		۰/۱۳۴	۰/۰۲۸	۰/۳۰۴	RM5780-G	
۰/۱	۰/۰۲۰	۰/۰۰۴	۰/۰۵۹	RM3625-E			۰/۰۳۳	۰/۰۰۹	۰/۰۹۱	RM3294-B	
	۰/۰۰۷	۰/۰۰۶	۰/۲۰۳	RM6230-D			۰/۰۴۷	۰/۰۴۵	۰/۰۹۶	RM5424-D	
	۰/۰۵۱	۰/۰۰۲	۰/۱۶۸	RM8005-C			۰/۰۵۳	۰/۰۰۰	۰/۲۴۵	RM7118-B	
	۰/۰۹۱	۰/۰۰۰	۰/۳۷۱	RM3658-F			۰/۰۲۰	۰/۰۰۰	۰/۱۲۲	RM8206-C	
۱۶	۰/۱۹۲	۰/۰۰۹	۰/۵۲۱	RM6230-D	YI	۰/۱۱۰	۰/۰۳۱	۰/۰۲۶	۰/۰۷۲	RM549-E	STI
۰/۲	۰/۰۵۷	۰/۰۰۱	۰/۲۰۳	RM3625-E			۰/۰۶۷	۰/۰۲۴	۰/۱۵۵	RM6324-B	
	۰/۰۷۲	۰/۰۰۱	۰/۲۴۶	RM519-D			۰/۰۳۵	۰/۰۰۱	۰/۱۲۱	RM5780-G	
	۰/۰۹۸	۰/۰۰۷	۰/۲۷۶	RM5761-B			۰/۰۲۴	۰/۰۰۶	۰/۰۶۹	RM462-B	
							۰/۰۶۴	۰/۰۲۴	۰/۱۵۰	RM5424-E	
							۰/۲۲۵	۰/۰۲۱	۰/۵۳۸	RM5424-D	
							۰/۱۴۳	۰/۰۰۰	۰/۵۴۴	RM3294-B	
						۰/۰۹۷	۰/۱۱۸	۰/۰۰۱	۰/۴۱۱	RM6179-E	MP
							۰/۱۳۲	۰/۰۰۱	۰/۴۴۵	RM5780-F	
							۰/۲۰۹	۰/۰۰۸	۰/۵۷۸	RM512-C	
							۰/۲۴۸	۰/۰۰۸	۰/۶۸۵	RM8005-C	
							۰/۴۵۲	۰/۰۰۱	۰/۵۶۶	RM3658-F	
						۰/۱۵۴	۰/۹۲۰	۰/۰۰۴	۰/۲۸۰۳	RM6230-D	SSI
							۰/۲۷۴	۰/۰۰۰	۰/۰۴۱	RM3625-E	
							۰/۳۴۷	۰/۰۰۱	۰/۲۹۱	RM519-D	
							۰/۴۷۲	۰/۰۱۰	۰/۲۶۰	RM5761-B	
							۰/۲۶۳	۰/۰۰۰	۰/۱۴۳	RM441-B	
							۰/۳۹۴	۰/۰۰۳	۰/۲۴۰	RM5780-C	
						۰/۱۴۵	۰/۲۶۵	۰/۰۰۴	۰/۷۸۷	RM519-C	TOL
							۰/۲۵۷	۰/۰۲۳	۰/۶۰۲	RM6324-A	
							۰/۱۴۳	۰/۰۲۸	۰/۳۲۴	RM5711-A	



14. Katouzi, M., S. Navabpour, A. Yamchi, S.S. Ramezanzpour and H. Sabouri. 2017. Identification of Genes Controlling Seedling Stage Traits in Iranian Rice Recombinant Lines under Drought Stress. *Conditions Journal of Crop Breeding*, 9(21): 1-9.
15. Mcharo, M., D.R. Labonte, J.H. Oard, S.J. Kays and W.J. Mclauri. 2004. Linking quantitative traits with AFLP markers in sweet potatoes using discriminate analysis, *Acta Hort*, 637: 285-293.
16. Martinez, L., P. Caragnaro, R. Masuekki and J. Rodriguez. 2003. Evaluation of diversity among Argentine grapevine (*Vitis vinifera* L.) varieties using, morphological data and AFLP markers. *Journal of Biotechnology*, 6: 241-250
17. Moghaddam, A. and M.H. Hadizade. 2002. Response of corn (*Zea mays* L.) hybrids and their parental lines to drought using different stress tolerance indices. *Plant See*, 18: 255-272.
18. Majedi, M.M. and O. Sharfi. 2013. Association analysis for morphological traits in *Brassica* species using microsatellite markers. *Journal Modern Genetics*, 9: 179-188 (In Persian).
19. Normand Movid, F.D., M.H. Rostami and M.R. Ghanadha. 2001. Evaluation indicators of drought tolerance in wheat. *Iranian Journal of Agricultural Sciences*, 32: 795-805 (In Persian).
20. Rosielle, A.A. and Hambelen, J. 1981. Theoretical aspect of selection for yield in stress and nonstress environment. *Crop Science*, 21: 943-946.
21. Rao, L.S., P. Usha Rani, P.S. Deshmukh and S.K. Panguluri. 2007. RAPD and ISSR fingerprinting in cultivated chickpea (*Cicer arietinum* L.) and its wild progenitor *Cicer reticulatum* Ladizinsky. *Genetics Resources and Crop Evolution*, 54: 1235-1244.
22. Sharma, B.D. and D.K. Hore. 1993. Multivariate analysis of divergence in upland rice Indian. *Journal of Agricultural Science*, 63: 515-517.
23. Schnider, K.A., R. Rosales-Serna, F. Ibarra-Perez, B. Cazares-Enriques, J.A. Acosta-Gallegos, P. Ramirez-Allejo, N. Wassimi and J.D. Kelly. 1997. Improving common bean performance under drought stress. *Crop Sci*, 37: 43-50.
24. Shokrpur, M., A. Mohammadi, A. Ziaeebidhendi and A. Javanshir. 2008. Association analysis of morphological markers, AFLP, biochemical and molecular markers in plant milk thistle (*Silybum marianum* L.). *Faculty of Medicinal and Aromatic Plants Research Quarterly*, 24: 292-278 (In Persian).
25. Srividhya, A., L.R. Vemireddy, S. Sridhar, M. Jayaprada, P.V. Ramanarao, A.S. Hariprasad, H.K. Reddy, G. Anuradha and E. Siddiq. 2011. Molecular mapping of QTLs for yield and its components under two water supply conditions in rice (*Oryza sativa* L.). *Journal of Crop Science and Biotechnology*, 14: 45-56.
26. SES. 2002. Standard evaluation system for rice. International Rice Research Institute Manila, Philippines
27. Von Braun, J. and D. Virchow. 1996. Economic evaluation of biotechnology and plant diversity in developing countries. *Plant research and development*, 43: 77-88.
28. Zaharieva, M., E. Gaulin, M. Havaux, E. Ac evedo and P. Monneveux. 2001. Drought and heat responses in the wild wheat relative *Aegilops geniculata* Roth. *Crop Science*, 41: 1321-1329.
29. Zheng, J.G., G.J. Ren, X.J. Lu and X.L. Jiang. 2003. Effect of water stress on rice grain yield and quality after heading stage. *Chinese J. Rice Sci*, 3: 239-243.

## Relationship between ISSR and SSR Markers Indicators of Drought Tolerance in Rice Genotypes

Reza Karim Koshte<sup>1</sup> and Hossein Sabouri<sup>2</sup>

---

1- Graduated M.Sc. Student of Agricultural Biotechnology, Payam Noor university of Karaj

(Corresponding author: rezakarim597@yahoo.com)

2- Associate Professor of Plant Production, College of Agriculture and Natural Resources, Gonbad Kavous University

Received: February 10, 2015

Accepted: June 12, 2017

---

### Abstract

Breeding of rice for drought tolerance requires proper evaluation and analysis of genetic diversity in breeding populations related to drought tolerance. In order to identify indices for tolerant and sensitive rice genotypes to drought stress, an experiment with 59 genotypes of rice was conducted based of a complete block design with three replications in non-stressed (flooding) and stressed conditions in 2013. Analysis of correlations between the performance of flooding and drought stress tolerance index showed that the indices SSI, STI, MP, GMP, HM and YI as are superior indices for both flooding and drought conditions. Stepwise regression analysis between microsatellite and microsatellite molecular data with indices, a total of 57 and 44, informative markers were identified respectively. The most variations based on microsatellite data on stress tolerance index (STI) was explained with 0.541 by gene loci of RM5424-E, RM462-B, RM549-E, RM8206-C, RM7118-B, RM5424-D, RM3294-B, RM6324-B, RM5780-G and the most variations between microsatellite data based on the performance index (YI) was explained with 0.469 by gene loci of ISSR3-1, ISSR1-6, ISSR2- 8, ISSR9-1, ISSR10-8, ISSR10-10. Results of present study provided a few preliminary data for indirect selection of useful traits using molecular markers.

**Keywords:** ISSR, Rice, Stepwise regression, SSR, Tolerance Indices