



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

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

<sup>۱</sup>- دانش آموخته کارشناسی ارشد، دانشگاه پیام نور کرج، (تویستنده مسؤول: rezakarim597@yahoo.com)

<sup>۲</sup>- دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه گندکاووس

تاریخ پذیرش: ۹۶/۱۱/۲۲

### 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 شرایط تنش خشکی، ۵۹ ژنوتیپ برنج در قالب طرح بلوك‌های 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 شاخص تحمل به خشکی نشان داد که شاخص‌های YI، HM، GMP، MP، STI،SSI 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 ریزماهواره و بین ریزماهواره با شاخص‌ها، در مجموع به ترتیب ۵۷ و ۴۴ نشانگر آگاهی بخش با شاخص‌ها شناسایی شد. بیشترین توجیه تغییرات بر اساس داده‌های ریزماهواره مربوط به شاخص تحمل به تنش (STI) با ۵۴٪ توسط مکان‌های ژنی RM5780-، RM6324-B، RM3294-B، RM5424-D، RM7118-B، RM8206-C، RM549-E، RM462-B و RM5424-E تبيين شد و بیشترین توجیه تغییرات بر اساس داده‌های بین ریزماهواره مربوط به شاخص عملکرد(YI) با ۴۶٪ توسط مکان‌های ژنی ISSR1-1، ISSR1-6، ISSR9-1، ISSR2-8 و ISSR10-10 بود. از نتایج این تحقیق در تامین 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 نیقصمه، محدود بودن تعداد نشانگرهای مورفولوژیک و متأثر بودن آنها از عوامل محیطی سبب شد که اینگونه نشانگرها محدود شود. پیشرفت علوم بیوتکنولوژی و شناسایی نشانگرهای مولکولی به ویژه نشانگرهای میتنی 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 و راثت صفات در گیاهان زراعی و ساختار و سازماندهی ژنوم مشخص شده است (۱۵، ۱۶). در حال حاضر مهم‌ترین شاخص تحمل به تنش خشکی مورد استفاده در برنامه‌های بهترادی 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 متتحمل 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. روزبیل و هامبلین (۲۰) شاخص تحمل (TOL) و میانگین بهره‌وری (MP) را ارائه کردند.

برنج نیازهای تغذیه‌ای حدود نیمی از جمعیت جهان را تامین 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 درصد افزایش یابد تا نیاز مصرف کنندگان تامین 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، ۲۸). برای استفاده مناسب از این سرمایه عظیم، اطلاع از ماهیت و میزان تنوع موجود در ژرم پلاسم، از اهمیت بسیار زیادی برخوردار است (۲۲). تخمین میزان تنوع ژنتیکی به عنوان یکی از گام‌های پایه‌ای و اساسی در نگهداری و حفاظت مواد ژنتیکی در بانک بذر و اجرای برنامه بهترادی است (۹، ۱۴). به عبارت دیگر ارزیابی تنوع ژنتیکی برای مدیریت مؤثر و حفظ منابع ژرم پلاسم و همچنین اجرای برنامه‌های بهترادی دارای اهمیت فراوانی می‌باشد و الدینی 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 ریزماهواره‌ای و بین ریزماهواره‌ای بود.

### مواد و روش‌ها

#### آزمایش مزرعه‌ی و اندازه‌گیری صفات

به منظور ارزیابی تحمل ژنتیپ‌های برنج به تنش خشکی شناسایی نشانگرهای مرتبط با عملکرد در ۵۹ ژنتیپ 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  $5^{\circ}45'51''$  شرقی و عرض جغرافیایی  $36^{\circ}54'36''$  شمالی با ارتفاع ۱۳۶۶ 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) ژنتیپ‌ها در پنج ریف به صورت  $25 \times 25$  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 بهطور یکسان به‌طور غرقاب انجام شد سپس برای ایجاد تنش، آبیاری از ۴۰ روز پس از نشاء (مرحله حداقل 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 ژنتیپ 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 انجام شد. نتایج حاصل از تجزیه خاک در جدول (۲) آمده است.

فیشر و مور (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. بوسالاما و همکاران (۳) شاخص پایداری عملکرد (YSI) و گاویز و همکاران (۱۱) شاخص عملکرد (YI) را معرفی کردند. ابراهیمی و همکاران (۶) در تحقیقی ارتباط بین صفات زراعی و نشانگرهای مولکولی در جو با استفاده از ۱۰ صفت زراعی و ۷۰ نشانگر مولکولی حاصل از ۱۰ جفت آغازگر ریزماهواره روی ۱۱۵ ژنتیپ بومی جو مورد مطالعه قرار دادند. آغازگرهای Bamc0306، GMS003، HVM20 و HvHV A1 و تغییرات بیشتری از صفات مورد بررسی را نشان دادند. مندولانی و همکاران (۱) ارتباط بین ۶۸ ژنتیپ باadam زمینی و ۱۳ جفت آغازگر ریزماهواره 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، Ah4-4 و Ah51 تبیین شدند. مجیدی و همکاران (۱۸) در پژوهشی ارتباط ۲۷ جفت آغازگر ریزماهواره با ۱۶ صفت مورفولوژیکی در ۳۶ نمونه از ۷ گونه جنس براسیکا توسط رگرسیون گام‌به‌گام مورد ارزیابی قرار دارند. مقدار قابل توجهی از تغییرات مورفولوژیک توسط نشانگرهای BRMS-008 و BRMS-024 توجیه شد که نشان می‌دهد احتمالاً ژن‌های مربوط به این صفات در مکان‌های کروموزومی نزدیک به هم قرار دارند. شکرپور و همکاران (۳۴) در بررسی رابطه بین نشانگرهای مورفولوژیکی، فیتوشمیایی 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 مشبت 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 ژنتیپ

جدول ۱- ژنوتیپ‌های مورد بررسی در آزمایش

Table 1. Evaluated genotypes in experiment

منشاء	ژنوتیپ‌ها	منشاء	ژنوتیپ‌ها	منشاء	ژنوتیپ‌ها	منشاء	ژنوتیپ‌ها
IRRI(فیلیپین)	IR65907-116-1-B	۴۶	ایران	LINE 213	۳۱	IRRI(فیلیپین)	IR60080-42
IRRI(فیلیپین)	IR65261-09-1-B	۴۷	ایران	ANBARBO	۳۲	ایران	SANGJO
IRRI(فیلیپین)	IR30	۴۸	IRRI(فیلیپین)	IR66417-18-1-1-1	۳۳	IRRI(فیلیپین)	USEN
IRRI(فیلیپین)	IR62761-20	۴۹	فیلیپین	CT6516-24-3-2	۳۴	IRRI(فیلیپین)	IR67015-49-2-6
IRRI(فیلیپین)	IR 55411-50	۵۰	IRRI(فیلیپین)	IR7471-199-1-302	۳۵	IRRI(فیلیپین)	IRAT170
IRRI(فیلیپین)	IRAT216	۵۱	IRRI(فیلیپین)	IRGC-15092RT-1031-62	۳۶	IRRI(فیلیپین)	IR62752-07
هند	SAMBA MAHSURI	۵۲	IRRI(فیلیپین)	B6144F-MR-6-0-0	۳۷	هند	Palawan
IRRI(فیلیپین)	IR70358-84-1-1	۵۳	IRRI(فیلیپین)	IR69626B	۳۸	IRRI(فیلیپین)	IR55423-01
IRRI(فیلیپین)	CT6510-24-7-8	۵۴	هند	WAB638-1	۳۹	IRRI(فیلیپین)	CT6510-24-7-8
IRRI(فیلیپین)	IR60080-46A	۵۵	IRRI(فیلیپین)	IR60080-46A	۴۰	هند	NONABOKA
IRRI(فیلیپین)	UPLRI-7	۵۶	ایتالیا	Pegaso	۴۱	IRRI(فیلیپین)	IR3441-97
ایران	LINE226	۵۷	IRRI(فیلیپین)	IR63371-38	۴۲	هند	DAGADDESHI
ایران	LINE 835	۵۸	IRRI(فیلیپین)	CT13382-8-3-M	۴۳	IRRI(فیلیپین)	IR63372-15
IRRI(فیلیپین)	AUS196	۵۹	IRRI(فیلیپین)	IRAT177	۴۴	IRRI(فیلیپین)	IR70360-38-1-B-1
			IRRI(فیلیپین)	IR66421-062-1-1-2	۴۵	IRRI(فیلیپین)	IRAT212
						IRRI(فیلیپین)	IR63380-08

جدول ۲- مشخصات نمونه خاک مزرعه مورد آزمایش

Table 2. Soil characteristic for an experimental farm

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

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 ریز ماهواره (جدول ۴) در آزمایشگاه انجام گرفت.

اندازه‌گیری شاخص‌های حساسیت به تنفس با استفاده از عملکرد ژنوتیپ‌های مورد بررسی در شرایط غرقاب و تنفس براساس روابط پیشنهادی فیشر و مورر (A)، روزیل وهاملین (Z) و فرنانذر (V) با استفاده از عادله‌های زیر محاسبه شدند:

۱- شاخص حساسیت به تنفس (SSI):

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

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

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

$$TOL = YP - YS$$

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

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

۳- شاخص تحمل به تنفس

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

Table 3. Evaluated Inter Simple Sequence Repeat in experiment

نشانگرها	توالی آغازگر (۳-۵)	دماهی اتصال	نشانگرها	توالی آغازگر (۳-۵)	دماهی اتصال	نشانگرها	توالی آغازگر (۳-۵)
(ATG) <sub>4</sub>		۴۱/۹	ISSR-6		۵۹/۱	(CAG) <sub>4</sub>	ISSR-1
(CCA) <sub>4</sub>		۴۴/۷	ISSR-7		۴۳/۸	(GAAT) <sub>4</sub>	ISSR-2
(CT) <sub>8</sub> A		۵۰	ISSR-8		۴۸	(CCTA) <sub>4</sub>	ISSR-3
(ACTG) <sub>4</sub>		۴۸	ISSR-9		۵۰	(CT) <sub>8</sub> T	ISSR-4
(GT) <sub>6</sub> CC		۴۴	ISSR-10		۶۱/۱	(CCA) <sub>4</sub>	ISSR-5

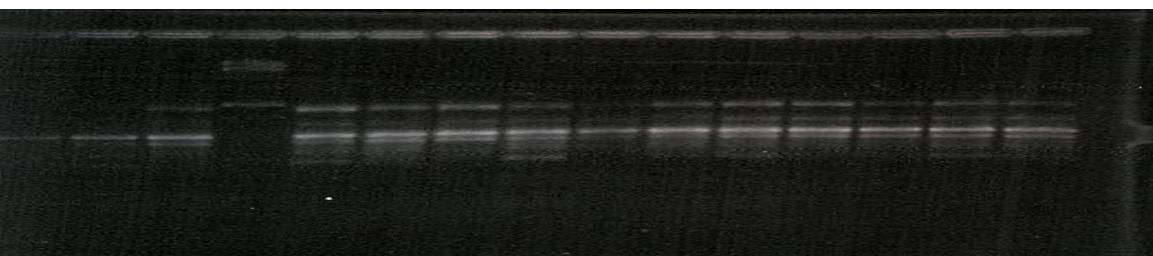
جدول ۴- نشانگرهای ریزماهواره (SSR) مورد بررسی در آزمایش

Table 4. Evaluated Simple Sequence Repeat in experiment

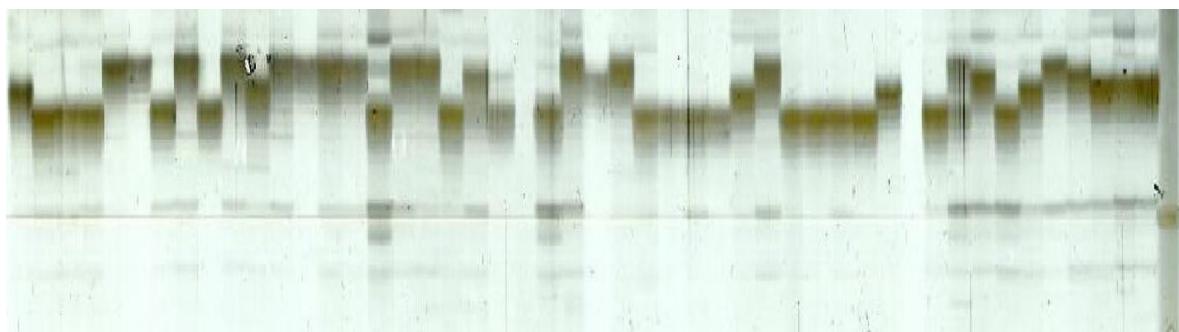
نشانگرها	آغازگر همسو	آغازگر معکوس
RM462	CCCGGAATTCACTCAGACTGC	TCTAGGAGGAGATGGCGGAGTAGC
RM3148	GCTTTGGTATTGCAAGGTTCACG	CTATTGCTCGAACACTTGCTTCCTCC
RM6324	CTGTACAAGAACGGCAGCAACC	GCACCAACAAACAGAGACAGAGG
RM6230	ATGCATGCAAGCGAATTTCACC	GCCGTTCTCTGTGACGATGG
RM3294	CTCGTCTCTCATGCATATCAGC	TGCCCTGCTCTTGTCTTACTCC
RM5780	TGCCACAGTAGCATCAAACG	ACTAGCTGCTGCATCTCTACTGC
RM132	CTTCTCTCGCCTACGCCCTCC	TCGACGAGGTTGATCAGTAGGG
RM523	TGAATTCTGCACATGGTCAGC	TGGGAGGTTGCTAGGTAATCC
RM5761	AAGATTACCCGGGATTGTAGTGG	AGTCTAGTCGTCCTCACATGG
RM8213	TGTTGGGTGGTAAAGTAGATGC	CCCAGTGATACAAGATGAGTTGG
RM3658	GTAGCACTCGCTGCTCGTCTCC	AATCCCACCCGCCCTCATCTCC
RM5424	TAAGGTGTCGGACAAGAACCG	GATCGATCTGGAGGATTGAAAGG
RM3419	TGCTGCTATTCTCAAGAACAAACC	CTTGGTGAACAGTGTCTCTGG
RM7118	CACCGTAGCTAACATCAAGC	GATCAAAGATGCGTGTACGTTGG
RM5140	GGCACTCGTATTCTCAACTCTCC	GGGTGTATCAGGAGTACAGGTTGC
RM7420	CACAAAGCAAGCACCCAGAAGG	TCATGGCGTGAAGGAAGGAAGG
RM6773	GCTGCTCCACCTTCACCTTCC	CGATGGTGTGTTGTTGGTTGC
RM549	ATCCCCTGAACCCAATTCTGTGCG	CTCTTGATCTCCGGTGTGATTTCG
RM427	TTGAGCTGATGAGAGTTGGTGTG	CTGTCACTAGCTGCCCCGTACCC
RM5711	GGACGGAAGGAATACGTCGTAGG	CTGTCCATGCACTCATCTCTAGC
RM3583	ACCATGAGGTCACTTGATACGC	GCCATGTCACTCATCTGATCTTTCC
RM8005	CATTCCACAGCGTGGATATTG	CTTGTCCATCTGCCGTACTCC
RM38	ACGAGCTCTCGATCAGCCTAGC	CACTCATGGAAGAGGCAAGC
RM5647	GTTCATCCAGACATTGAGAACG	TAAACTGGTCGTGGACAGTGC
RM8206	AATCCACCTGGCCCTAACCTTCC	CACTGCTGCTCTCCCTCTGC
RM7038	GATTAGAGCTTGGTGGTCTTGG	ACTTGTGGTCGGTGTGGTAGTCC
RM5652	CGCGTAGCTAACGATCAA	TCAAAGATGCGTGTACGTT
RM474	TACACGAGGGAGTACTCGAATGG	CATGGAGGTATAGAAGAGCATTGG
RM6179	GGCGCCGGAGATGATAAGC	AGCGGCATCTCGTCCATCTCC
RM7545	GTTCATCATCCGTGCTATTG	CACGATTCTCACATACGAGAGC
RM441	AAGGGAGTAGCCTCTCCATCTCC	GTGCTGACTCCTCTCCCTGTCC
RM3625	TGCAATTTCATCCACCCATCTCG	ACGAGTGCACGCGTGTCAATTGG
RM7091	GCTGCAGATAGATGGATGGTATGG	AGATGCCATGTGGCGGTTAGG
RM512	TGCAGTGAATGGAGACCACTAG	CGGTGAGTCCCATATCTTCAACC
RM6022	ATCAATCGCTCATCGAATCAGC	TCGACCTGGACTCCATTACTCG
RM519	AATTTCGGCAAATCAGCATCC	TCATCTGGACACTCGAGGTAACG

سپس محصولات تکثیر یافته واکنش زنجیرهای پلیمراز با استفاده از ژل آغازگر ۱/۵ درصد با ولتاژ ۱۰۰ به مدت ۵۰ دقیقه الکترفورز شد. ژل‌ها به مدت ۱۲ دقیقه در محلول اتیدیوم بروماید رنگ‌آمیزی شدند و توسط دستگاه عکس برداری از ژل (ژل ۱۲ دقیقه) 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 الکترفورز ژل پلی آکریلید ۶ درصد و برای آشکارسازی الگوی نواربندی از روش رنگ‌آمیزی نیترات نفره استفاده شد. مقدار شاخص‌های تش برای هریک از ژنوتیپ‌ها، همبستگی بین شاخص‌های و عملکرد دانه در شرایط نرمال و تش خشکی و رگرسیون گام به گام با استفاده از نرم‌افزارهای PAST و SPPS و انجام گرفت.

استخراج برگ‌های جوان گیاهچه‌های ۲۱ روزه در مرحله چهار برگی با استفاده از روش CTAB تغییر یافته (۱۳) انجام شد. برای تعیین کمیت و کیفیت DNA استخراجی از روش اسپکتروفوتومتری و الکتروفورز آغازگر ۱ درصد استفاده شد. تکثیر قطعه DNA با واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل ۱/۵ میکرولیتر PCR Master PCR، ۱۰ میکرولیتر ۱/۵ میکرولیتر DNA و ۱/۵ میکرولیتر از هر آغازگر به همراه یک قطره رونگ مینیمال برای جلوگیری از تبخیر انجام گرفت. برای تکثیر نشانگرهای ISSR واکنش PCR با دستگاه ترموموایکر با برنامه PCR شامل مراحل و اسرشت‌سازی اولیه به مدت ۵ دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد در ادامه ۳۵ چرخه به صورت و اسرشت‌سازی 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 ۹  
Figure 1. Bands of ISSR9 marker



شکل ۲- تصویر فرآورده PCR نمونه ۵۹ ژنوتیپ مورد بررسی بر روی ژل پلی آکرمید ۶ درصد (آغازگر ۱۴۸) (RM3148 marker)  
Figure 2. PCR product of 59 evaluated genotypes on polyacrylamid gel 6% (RM3148 marker)

CT6510-JR 55411-50, USEN, JR65907-116-1-B  
JR66417-18-1-1-1 JR63380-08, 24-1-2  
LINE226, JR 53236-342, IR66421-062-1-1-2  
IR70358-84-1-1, IR60080-48, CT6510-24-7-8  
IR66424-1-2-, CT6510-24-1-2, DAGADDESHI  
LINE 213, Way Rarem, Palawan, 1-5  
ژنوتیپ‌های متحمل به تنش شناسایی شدند، میزان بالای  
عددی این شاخص‌ها نشاندهند تحمل نسبی  
به تنش است. ژنوتیپ‌های 1-1-1-18-1-1-1 و  
IR66417-18-1-1-1 IR68702-072-1-4-B  
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. به طور 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 امکان‌بندی  
است. از لحاظ شاخص حساسیت به تنش SSI مقادیر عددی  
پایین نشاندهند تحمل بالای ژنوتیپ‌ها و مقادیر بالا  
نشاندهند 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 متتحمل را بدون توجه به پتانسیل  
عملکرد آنها مشخص کرد (۸). این شاخص به منظور یافتن  
ژنوتیپ‌های متحمل کارایی بالای 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 IR68702-072-1-4-4, IRAT216, Caiapo, IR63380, JR 55411-50, Pegaso, IR60080-46A, B, IR66421-062-1-1-2, JR70360-38-1-B-1-08, IR65907-116-1-B را به عنوان ژنوتیپ‌های متحمل به تنش شناسایی شدند، میزان بالای عددی این شاخص‌ها نشاندهند تحمل نسبی به تنش است (جدول ۷). براساس شاخص (HM) از بین ۵۹ ژنوتیپ مورد بررسی به ترتیب IR66421-062-1-1-2, IR70358-84-1-1, IR66421-062-1-1-2, USEN, Pegaso, IRAT216, IR68702-072-1-4-B, IR63380-08, LINE226, DAGADDESHI, IR70360-38-1-B-1, 55411-50 را به عنوان ژنوتیپ‌های متحمل به تنش شناسایی شدند، میزان بالای عددی این شاخص‌ها نشاندهند تحمل نسبی به تنش است. شاخص (MP) به ترتیب ژنوتیپ‌های Caiapo, IR60080-46A, IR68702-072-1-4-B, IRAT216

متتحمل به تنش شناسایی شدن، میزان بالای عددی این شاخص‌ها نشانده‌نده تحمل نسبی به تنش است (جدول ۷). براساس شاخص مورد بررسی در این آزمایش می‌توان IR68702-072-1-4-B، Pegaso، Caiapo ژنوتیپ‌های IR66421-062-1-1-2، Panda IR 55411-50 IRAT216، GADDESHI A هم‌بستگی شاخص‌های مقاومت نشان داد که هم‌بستگی متحمل به تنش معرفی کرد. هم‌بستگی بین شاخص‌ها تحمل به خشکی و عملکرد می‌تواند به عنوان معیاری مناسب برای بهترین ژنوتیپ‌ها و شاخص‌ها به کار رود. نتایج ضرایب هم‌بستگی شاخص‌های مقاومت با شاخص حساسیت به عملکرد در شرایط غرقاب به ترتیب با شاخص‌های (SSI)، (GMP)، (MP)، (STI)، (HM)، (YI) معنی‌دار بود که بیشترین آن مربوط به هم‌بستگی با شاخص حساسیت به تنش ( $r = -0.74$ ) بود و در شرایط تنش نیز شاخص‌های (SSI)، (GMP)، (MP)، (STI)، (HM)، (YSI) و (YI) معنی‌دار بود. هم‌بستگی بالایی با عملکرد نشان دادند که بیشترین آن مربوط به شاخص عملکرد ( $r = -0.99$ ) بود (جدول ۸). به طور کلی شاخص‌های که در هر دو محیط دارای هم‌بستگی بالایی با عملکرد دانه باشند می‌توانند به عنوان 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، MP، STI، GMP، HM و YI را به عنوان شاخص‌های برتر در هر دو شرایط غرقاب و تنش خشکی، قادرند ژنوتیپ‌های مقاوم با عملکرد بالا را نشان دهند. ژنوتیپ‌های Pegaso، Caiapo USEN IRAT216 IR70358-84-1، IR55411-50 IR60080-46A IR68702-072-1-1-2، DAGADDESHI IR63380-08-1 IR66421-062-1-1-2، 4-B IR66421-062-1-1-2، 4-B در رده بالایی قرار داشتند و با توجه به این که این شاخص‌ها به عنوان برترین شاخص‌ها در این تحقیق شناخته شدند، می‌توان این ژنوتیپ‌ها را به عنوان متتحمل‌ترین ژنوتیپ‌ها و ژنوتیپ‌های IR62761-20 IR60080-42 CT13382-8-10 LINE 835 UPLRI-7 IRAT177 3-M کمترین مقدار این شاخص‌ها را داشتند به عنوان 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.

جدول ۷- برآورد شاخص‌های مقاومت به خشکی ژنتیک‌های 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	-۳/۴۶	۳/۶۳۵	۲/۶۳	۲/۱	۳/۳۰	۳/۱	-۴/۱۶	۱/۰۵
IR 47686-12-5-B-1	۵/۰۹	۲/۴۸	-۰/۴۰۰	۳/۷۸۵	۴/۴۹	۲/۶۱	۳/۵۵	۳/۳۳	-۰/۴۸۸	۱/۲۲
Panda	۵/۰۷	۲/۴۶	-۰/۳۹۵	۳/۷۶۵	۴/۴۹	۲/۶۱	۳/۵۳	۳/۳۱	-۰/۴۸۵	۱/۲۱
Way Rarem	۵/۶۶	۲/۳۵	-۰/۴۲۱	۴/-۰۵	۴/۱۷	۳/۳۱	۳/۶۰	۳/۳۲	-۰/۴۱۵	۱/۱۶
IRFAON-308	۵/۲	۲/۳۱	-۰/۳۸	۳/۷۵۵	۴/-۷	۲/۱۹	۳/۴۶	۳/۱۹	-۰/۴۴۵	۱/۱۴
IR66421-062-1-1-2	۶/۰۶	۲/۶۵	-۰/۵۰۸	۴/۳۵۵	۴/۹۰	۲/۱۱	۴	۳/۶۸	-۰/۴۳۷	۱/۳۰
IR66417-18-1-1-1	۶/۳۵	۲/۲۷	-۰/۴۷۶	۴/۲۶۰	۴/۲۲	۳/۹۸	۳/۸۷	۳/۴۵	-۰/۳۷	۱/۱۶
IR 53236-342	۶/۴۳	۲/۲۷	-۰/۴۶۱	۴/۲۵۰	۳/۹۷	۴/۱۴	۳/۸۱	۳/۳۵	-۰/۳۵۲	۱/۱۱
Caiapo	۷/۲۹	۲/۷۴	-۰/۶۳۱	۵/۰۱۵	۵/۱۲	۴/۰۵	۴/۴۶	۳/۹۸	-۰/۳۷۶	۱/۳۵
IR68702-072-1-4-B	۷/۲۰	۲/۳۸	-۰/۵۴۱	۴/۷۹۰	۴/۲۴	۴/۸۲	۴/۱۳	۳/۵۷	-۰/۳۳۰	۱/۱۷
IR65907-116-1-B	۶/۸۸	۲/۲۸	-۰/۴۹۶	۴/۵۸۰	۴	۴/۶۰	۳/۹۵	۳/۴۲	-۰/۳۳۱	۱/۱۲
IR55419-04	۶/۳۳	۱/۵۲	-۰/۳۰۴	۳/۹۲۵	۲/۱۴	۴/۸۱	۳/۱	۲/۴۵	-۰/۲۴۰	۰/۷۵
Palawan	۵/۸۷	۲/۱۵	-۰/۳۹۹	۴/۰۱۰	۳/۸۳	۳/۷۷	۳/۵۵	۳/۱۴	-۰/۳۶۶	۱/۰۵
IR3441-97	۴/۶۵	۱/۵۶	-۰/۲۲۹	۳/۱۰۵	۲/۲۴	۳/۰۹	۲/۶۹	۲/۳۳	-۰/۳۳۴	۰/۷۶
IR70360-38-1-B-1	۶/۵۶	۲/۴۵	-۰/۵۰۸	۴/۵۰۵	۴/۴۱	۴/۱۱	۴/۰۱	۳/۵۶	-۰/۳۷۳	۱/۲۰
IR60080-42	۵/۳۸	۱/۰۶	-۰/۱۸۰	۳/۲۲۰	۱/۲	۴/۱۲	۲/۱۸	۱/۷۷	-۰/۱۶۵	۰/۵۲
IR77298-5-6	۴/۹۳	۲/۱۲	-۰/۳۳۵	۳/۵۲۵	۳/۶۱	۲/۱۸۱	۳/۲۶	۲/۹۶	-۰/۴۳۵	۱/۰۶
IR60080-48	۶/۱۵	۲/۲۲	-۰/۴۵۱	۴/۲۳۵	۴/۱	۲/۱۳	۳/۷۸	۳/۱۴	-۰/۳۷۷	۱/۱۴
IRAT170	۶/۱۲	۱/۷۸	-۰/۲۴۳	۳/۹۰۵	۲/۷۸	۴/۱۴	۳/۲۰	۲/۷۵	-۰/۲۹۱	۰/۸۸
سنگ جو	۵/۴۱	۲/۰۶	-۰/۳۵۲	۴/۷۳۵	۳/۴۶	۳/۲۵	۳/۱۴	۲/۹۸	-۰/۳۸۰	۱/۰۱
USEN	۶/۵۳	۲/۵۹	-۰/۵۳۴	۴/۵۶۰	۴/۷۶	۳/۹۴	۴/۱۱	۳/۷۰	-۰/۳۹۶	۱/۲۷
IR30	۵/۲۴	۱/۹۵	-۰/۲۲۴	۴/۵۹۵	۳/۱۹	۳/۱۹	۳/۲۰	۲/۸۴	-۰/۳۷۸	۰/۸۱
IR62752-07	۵/۲۹	۱/۴۴	-۰/۲۴۱	۳/۲۶۵	۱/۹۵	۳/۸۵	۲/۷۶	۲/۲۶	-۰/۲۷۲	۰/۷۱
IR62761-20	۵/۱۲	۰/۹۷	-۰/۱۵۷	۳/۰۴۶	-۰/۸۱	۴/۱۴	۲/۲۳	۱/۶۳	-۰/۱۹۰	۰/۴۸
NONABOKA	۴/۸۵	۱/۹۶	-۰/۳۰۰	۳/۴۰۵	۳/۲۲	۲/۱۹	۳/۰۸	۲/۷۹	-۰/۴۰۴	۰/۹۶
CT6510-24-1-2	۵/۱۹	۲/۳۹	-۰/۴۲۶	۴/۱۹۰	۴/۱۲	۳/۸۰	۳/۷۸	۳/۱۹	-۰/۳۸۸	۱/۱۲
IR7471-199-1-302	۵/۲۷	۲/۳۵	-۰/۳۹۱	۳/۱۱۰	۴/۱۷	۲/۹۲	۳/۵۲	۲/۷۰	-۰/۴۴۵	۱/۱۵
IR69626B	۵/۰۶	۱/۸۵	-۰/۲۹۶	۳/۴۵۵	۲/۹۵	۳/۱۱	۳/۶	۲/۷۰	-۰/۳۶۶	۰/۹۱
عبر بُوي ايلام	۵/۱۵	۱/۸۸	-۰/۳۰۵	۳/۵۱۵	۳/۲	۳/۲۷	۳/۱۱	۲/۷۵	-۰/۳۶۴	۰/۹۲
IR63371-38	۵/۳۱	۱/۸۰	-۰/۳۱۰	۳/۵۸۰	۲/۹۵	۳/۴۶	۳/۱۳	۲/۷۴	-۰/۳۴۷	۰/۹۱
IR63372-15	۴/۷۷	۲/۱۴	-۰/۲۳۳	۳/۴۵۵	۳/۶۶	۲/۸۳	۳/۲	۲/۹۵	-۰/۴۸۸	۱/۰۵
IR63377-08	۵/۲۹	۱/۵۸	-۰/۲۶۴	۳/۴۳۵	۲/۲۹	۳/۷۱	۲/۸۹	۲/۴۳	-۰/۲۹۸	۰/۷۸
IR55423-01	۴/۵۳	۱/۹۵	-۰/۲۸۰	۳/۲۴۰	۳/۱۹	۲/۵۸	۲/۹۷	۲/۷۶	-۰/۴۳۱	۰/۹۶
IR63380-08	۶/۰۵	۲/۴۷	-۰/۵۰۸	۴/۴۷۵	۴/۴۶	۴/۰۳	۴/۰۱	۳/۵۷	-۰/۳۸۰	۱/۲۲
B6144F-MR-6-0-0	۴/۳۵	۰/۸۱	-۰/۱۱۱	۲/۵۸۱	-۰/۴۱	۳/۵۳	۱/۸۸	۱/۳۶	-۰/۱۸۶	۰/۴۰
CT6510-24-1-2	۴/۱۳	۲/۱۰	-۰/۲۷۴	۳/۱۱۵	۳/۵۶	۲/۰۳	۲/۹۵	۲/۷۸	-۰/۵۰۹	۱/۰۳
AUS196	۴/۲۰	۲/۲۸	-۰/۳۷۵	۳/۷۴۰	۴	۲/۹۲	۳/۴۴	۳/۱۷	-۰/۴۳۸	۱/۱۲
IR57924-24	۵/۴۸	۲/۰۹	-۰/۳۶۳	۳/۷۸۵	۳/۵۴	۳/۱۹	۳/۱۹	۳/۰۲	-۰/۳۸۲	۰/۰۳
IR66424-1-2-1-5	۵/۰۹	۲/۴۴	-۰/۴۳۳	۴/۰۱۵	۴/۹	۳/۱۵	۳/۷۰	۳/۱۹	-۰/۴۷۷	۱/۰۲
CT6516-24-3-2	۵/۳۰	۱/۵۳	-۰/۲۵۶	۳/۴۱۵	۲/۱۷	۳/۷۷	۲/۸۵	۲/۳۷	-۰/۲۸۹	۰/۷۵
CT13377-4-2-M	۵/۰۸	۲/۲۲	-۰/۳۹۲	۳/۹۰۰	۳/۸۵	۳/۲۶	۳/۰۲	۳/۱۷	-۰/۴۹۴	۱/۰۹
IR65261-09-1-B	۴/۱۹	۲/۱۷	-۰/۲۷۸	۳/۱۸۰	۳/۷۳	۲/۰۲	۳/۰۱	۲/۸۵	-۰/۵۱۸	۱/۰۷
CT13382-8-3-M	۴/۱۸	-۰/۱۶	-۰/۱۳۰	۲/۸۳۵	-۰/۰۳	۲/۹۵	۲/۰۳	۱/۴۵	-۰/۱۷۸	-۰/۴۲
IRAT177	۴/۹۰	-۰/۹۹	-۰/۱۵۳	۲/۹۴۷	-۰/۸۶	۲/۹۰	۲/۰۳	۱/۶۵	-۰/۲۰۲	-۰/۴۹
WAB638-1	۵/۲۸	۱/۸۵	-۰/۳۱۰	۳/۵۶۵	۲/۹۵	۳/۲۳	۳/۱۳	۲/۷۳	-۰/۳۵۱	۰/۹۱
IR60080-46A	۶/۷۱	۲/۵۳	-۰/۵۳۶	۴/۶۲۰	۴/۶۱	۴/۱۸	۴/۱۲	۳/۶۷	-۰/۳۷۶	۱/۲۴
Pegaso	۶/۰۷	۲/۶۷	-۰/۵۱۳	۴/۱۷۰	۴/۱۰	۴/۱۰	۴/۰۳	۳/۷۰	-۰/۴۴۱	۱/۳۲
IRAT212	۵/۶۸	-۰/۹۶	-۰/۱۷۲	۳/۲۲۰	-۰/۷۸	۴/۱۱	۲/۲۳	۱/۶۴	-۰/۱۶۹	-۰/۴۷
LINE 213	۵/۶۷	۲/۳۴	-۰/۴۲۰	۴/-۰۵	۴/۱۵	۳/۲۳	۳/۶۴	۳/۲۱	-۰/۴۱۳	۱/۱۵
IR 55411-50	۶/۵۷	۲/۴۵	-۰/۵۰۸	۴/۴۱۰	۴/۱۱	۴/۱۲	۴/۰۱	۳/۵۶	-۰/۳۷۸	۱/۲۰
IRAT216	۷/۰۸	۲/۶۷	-۰/۵۹۹	۴/۸۷۵	۴/۹۵	۴/۴۱	۴/۲۵	۳/۸۷	-۰/۳۷۷	۱/۳۱
IRGC-15092RT-1031-62	۵/۰۷	۲/۳۵	-۰/۳۷۵	۳/۷۱۰	۴/۱۷	۲/۷۲	۳/۴۵	۳/۲۱	-۰/۴۶۳	۱/۱۶
IR70358-84-1-1	۶/۲۰	۲/۰۸	-۰/۴۰۷	۴/۱۴۰	۳/۵۱	۴/۱۲	۳/۵۹	۳/۱۱	-۰/۳۳۵	۱/۰۲
CT6510-24-7-8	۶/۱۵	۲/۴۹	-۰/۴۷۷	۴/۱۲۰	۴/۵۱	۳/۶۶	۳/۸۹	۳/۰۴	-۰/۳۹۹	۱/۲۱
DAGADDISHI	۵/۷۵	۲/۵۳	-۰/۴۶۰	۴/۱۴۰	۴/۶۱	۳/۲۲	۳/۱۱	۳/۵۱	-۰/۴۴۰	۱/۲۴
SAMBA MAHSURI	۵/۹۹	۱/۹۸	-۰/۳۷۴	۳/۹۸۵	۳/۲۷	۴/۱	۳/۴۴	۲/۹۷	-۰/۳۳۰	۰/۹۷
UPLRi-7	۵/۰۹	-۰/۸۳	-۰/۱۴۸	۳/۲۱۴	-۰/۴۸	۴/۷۵	۲/۱۶	۱/۴۵	-۰/۱۴۹	-۰/۴۱
LINE226	۶/۰۷	۲/۶۳	-۰/۴۶۱	۴/۲۵۰	۴/۸۵	۳/۴۴	۴	۳/۶۶	-۰/۴۴۴	۱/۲۹
LINE 835	۵/۸۲	-۰/۸۷	-۰/۱۶۰	۳/۳۴۶	-۰/۰۶	۴/۹۴	۲/۲۵	۱/۵۱	-۰/۱۵۰	-۰/۴۳

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
-./۳۴۷**	-./۰۸۱	./۵۶۴**	./۷۰۰**	./۷۱۹**	./۷۴۶**	./۸۹۷**	./۷۴۶**	./۴۴۶**	۱
./۹۹۷**	./۸۴۸**	./۹۸۲**	./۹۹۹**	-./۳۰۱*	./۹۶۵**	./۷۹۶**	./۹۲۳**	۱	YP
./۹۲۱**	./۸۵۵**	./۹۶۱**	./۹۹۳**	./۰۷۸	./۹۲۳**	./۹۶۰**	۱	YS	
./۹۵۰**	./۳۶۴**	./۸۶۷**	./۹۴۳**	./۳۳۸*	./۹۹۵**	۱	STI		
./۹۹۷**	./۱۴۸**	./۹۸۱**	./۹۴۹**	-./۳۰۱*	۱		MP		
-./۲۹۸*	-./۷۴۵**	-./۱۶۱	./۰۰۹	۱			SSI		
./۹۴۷**	./۶۴۵**	./۹۸۰**	۱				TOL		
./۹۷۹**	./۷۶۰**	۱					GMP		
./۸۹۵**	۱						HM		
۱							YSI		
							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 تبین 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, ISSR2-8, ISSR1-6, ISSR91- شرفی (۱۸) در تجزیه ارتباطی صفات مورفو‌لوژیک با نشانگرهای ریزماهواره در گونه‌های جنس پراسیکا به این نتیجه رسیدند که مکان ژنی BRMS-008 بیشترین درصد از تغییرات صفات روز تا گلدهی (۰/۵۱) تعداد شاخه فرعی (۰/۰۵۶) 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 جوهرای 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 نشانگرهای بسیار حساس از بقیه استفاده 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 جایگاهای 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 به عنوان متغیرهای مستقل در ریزماهواره و بین ریزماهواره به عنوان 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 ریزماهواره شاخص تحمل به تنش 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 ۴۴ نشانگر بیشترین و کمترین تعداد نشانگرهای آگاهی بخش 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 آگاهی بخش 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 تغییرات بر اساس داده‌های ریزماهواره مربوط به شاخص تحمل به تنش (STI) با ۰/۰۴۱ توسط مکان‌های ژنی RM5424-E.

جدول ۹- نتایج تجزیه ارتباطی با استفاده از رگرسیون گام به گام برای شاخص‌های تحمل به تنش و داده‌های مولکولی ریزمماهواره در ژنوتیپ‌های مختلف بینج

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

R <sup>2</sup> ma x	خطای معیار	سطح معنی‌داری	ضریب رگرسیون استاندارد شده	نشانگرهای آکاهی بخش استاندارد شده	شاخص‌های تنش	R <sup>2</sup> max	خطای معنی‌داری	سطح معنی‌داری	ضریب رگرسیون استاندارد شده	نشانگرهای آکاهی بخش استاندارد شده	شاخص‌های تنش
۱۱ .۱۴	-/۱۷۰ .۱۷۲	-/۰۰۲ .۰۰۴	-/۰۰۵۶ .۰۸۲۶	RM3294-B RM5424-D	GMP	.۰/۰۹۶	۲۵۱/۸۰۸ ۲۱۱/۲۵۰	-/۰۰۱ .۰۰۰	-۸۷۶/۰۳۰ -۱۰۲/۰۴۱	RM512-C RM512-D	YP
	-/۵۳۰	-/۰۱۹	-/۱۲۸۳	RM6230-D			۳۲۲/۹۳۹	/.۰۰۰	۱۲۱/۰۹۱۷	RM5780-B	
	-/۱۴۱	-/۰۰۶	-/۰۰۸	RM8005-C			۱۵۴/۰۳۰	/.۰۰۹	۴۵۸/۰۴۶	RM7038-A	
	-/۲۴۷	-/۰۰۰	-/۰۰۷۷	RM3658-F			/.۰۱۱	/.۰۰۸	۰/۲۸۰	RM8005-C	
۱۱ .۱۰	-/۳۱۵ .۰۹۵	-/۰۰۳۰ .۰۰۰۲	-/۰۰۵ .۰۸۴۱	RM5870-B RM519-D	HM	.۰/۰۱۵۳	/.۰۱۸۵ .۰۳۷۷	/.۰۰۱ .۰۰۴	-/۰۶۴۲ -۱/۱۴۷	RM3658-F RM6230-D	
	-/۱۵۸	-/۰۰۷	-/۰۰۴۴۴	RM3625-E			/.۰۱۱۲	/.۰۰۰	-/۰۴۲۶	RM3625-E	YS
	-/۵۲۲	-/۰۱۵	-/۱۳۰۸	RM518-A			/.۰۱۴۲	/.۰۰۱	۰/۵۲۹	RM519-D	
	-/۰۱۸	-/۰۰۰	-/۰۰۸۱	RM8005-C			/.۰۱۹۳	/.۰۰۱۰	۰/۵۱۶	RM5761-B	
۲۱ .۰۱	-/۰۳۲	-/۰۰۱	-/۰۱۱۵	RM3658-F RM3625-E	YSI		/.۰۱۳۴	/.۰۰۲۸	-/۰۳۴	RM5780-G	
	-/۰۲۰	-/۰۰۴	-/۰۰۵۹	RM6230-D			/.۰۰۳۳	/.۰۰۹	-/۰۹۱	RM3294-B	
	-/۰۷	-/۰۰۶	-/۰۲۳	RM6230-D			/.۰۰۴۷	/.۰۰۴۵	-/۰۰۶	RM5424-D	
	-/۰۵۱	-/۰۰۲	-/۰۱۶۸	RM8005-C			/.۰۰۵۳	/.۰۰۰	-/۰۲۴۵	RM7118-B	
	-/۰۹۱	-/۰۰۰	-/۰۳۷۱	RM3658-F			/.۰۰۳۰	/.۰۰۰	-/۰۱۲۲	RM8206-C	
۱۶ .۰۲	-/۱۹۲	-/۰۰۹	-/۰۵۱	RM6230-D	YI	.۰/۰۱۰	/.۰۰۳۱	/.۰۰۲۵	/.۰۷۲	RM549-E	STI
	-/۰۵۷	-/۰۰۱	-/۰۲۰۳	RM3625-E			/.۰۰۷۰	/.۰۰۳	-/۰۱۵۵	RM6324-B	
	-/۰۷۲	-/۰۰۱	-/۰۳۴۶	RM519-D			/.۰۰۲۵	/.۰۰۱	-/۰۱۲۱	RM5780-G	
	-/۰۹۸	-/۰۰۷	-/۰۳۷۶	RM5761-B			/.۰۰۲۴	/.۰۰۶	-/۰۰۵۹	RM462-B	
							/.۰۰۴	/.۰۰۴	-/۰۱۵۰	RM5424-E	
							/.۰۰۲۵	/.۰۰۲۱	-/۰۵۳۸	RM5424-D	
							/.۰۱۴۳	/.۰۰۰	-/۰۵۴۴	RM3294-B	
							/.۰۱۱۸	/.۰۰۱	۰/۴۱۱	RM6179-E	MP
							/.۰۱۲۲	/.۰۰۱	-/۰۴۴۵	RM5780-F	
							/.۰۲۹	/.۰۰۸	-/۰۵۷۸	RM512-C	
							/.۰۲۴۸	/.۰۰۸	۰/۶۸۵	RM8005-C	
							/.۰۴۵۲	/.۰۰۱	-/۰۵۶۶	RM3658-F	
							/.۰۹۲۰	/.۰۰۴	-۲/۸۰۳	RM6230-D	SSI
							/.۰۲۷۴	/.۰۰۰	-/۰۰۴۱	RM3625-E	
							/.۰۳۳۷	/.۰۰۱	۱/۲۹۱	RM519-D	
							/.۰۴۷۲	/.۰۰۱	۱/۶۴۰	RM5761-B	
							/.۰۴۶۳	/.۰۰۰	-/۱۴۳	RM441-B	
							/.۰۳۹۴	/.۰۰۳	۱/۲۴۰	RM5780-C	
							/.۰۲۶۵	/.۰۰۴	.۷۸۷	RM519-C	TOL
							/.۰۲۸۷	/.۰۰۳	۰/۶۰۲	RM6324-A	
							/.۰۱۴۳	/.۰۰۲۸	-/۰۳۲۴	RM5711-A	

جدول ۱۰- نتایج تجزیه ارتباطی با استفاده از رگرسیون گام به گام برای شاخص‌های تحمل به تنش و داده‌های مولکولی بین ریزماهواره در ژنتیپ‌های مختلف برنج

Table 10. Result of association analysis using stepwise by step regression between tolerance indices and molecular ISSR data

R <sup>2</sup> max	خطای میار	سطح معنی‌داری	سطح معنی‌داری استاندارد شده	ضریب رگرسیون استاندارد شده	شاخص‌های آگاهی بخش	شاخص‌های تنش	R <sup>2</sup> max	خطای میار	سطح معنی‌داری	سطح معنی‌داری استاندارد شده	ضریب رگرسیون استاندارد شده	شاخص‌های آگاهی بخش	شاخص‌های تنش	
-0.99	-/144	-/0.3	-/444	ISSR2-8	GMP	-/195	-/179	-/0.0	-/722	-/722	ISSR7-2	YP		
	-/141	-/0.2	-/454	ISSR1-6			-/164	-/0.7	-/462	-/462	ISSR2-6			
	-/142	-/0.27	-/322	ISSR9-1			-/164	-/0.11	-/431	-/431	ISSR6-9			
	-/134	-/0.8	-/372	ISSR10-8			-/172	-/116	-/0.1	-/414	ISSR2-8	YS		
	-/134	-/0.21	-/319	ISSR3-8			-/113	-/0.2	-/364	-/364	ISSR9-1			
-0.140	-/147	-/0.1	-/542	ISSR2-8	HM		-/113	-/0.35	-/245	-/245	ISSR1-6			
	-/144	-/0.4	-/430	ISSR9-1			-/107	-/0.6	-/305	-/305	ISSR10-8			
	-/144	-/0.4	-/438	ISSR1-6			-/107	-/0.6	-/307	-/307	ISSR10-10			
	-/136	-/0.5	-/42	ISSR10-8			-/107	-/0.14	-/71	-/71	ISSR3-1			
	-/137	-/0.23	-/321	ISSR3-8			-/0.98	-/0.33	-/0.1	-/120	ISSR7-2	STI		
	-/135	-/0.3	-/316	ISSR10-10			-/0.78	-/1.8	-/1.68	-/1.68	ISSR10-8			
-0.229	-/0.23	-/0.0	-/91	ISSR2-8	YSI		-/0.31	-/0.7	-/0.86	-/0.86	ISSR7-11			
	-/0.21	-/0.13	-/0.53	ISSR2-4			-/0.28	-/0.22	-/0.67	-/0.67	ISSR2-6			
-0.166	-/0.56	-/0.1	-/200	ISSR2-8	YI	-/143	-/0.00	-/140	-/608	ISSR7-2	MP			
	-/0.55	-/0.1	-/189	ISSR1-6			-/0.05	-/120	-/77	-/77	ISSR7-11			
	-/0.55	-/0.27	-/125	ISSR9-1			-/0.09	-/120	-/326	-/326	ISSR2-6			
	-/0.52	-/0.4	-/155	ISSR10-8			-/0.30	-/118	-/264	-/264	ISSR10-8			
	-/0.52	-/0.7	-/148	ISSR10-10			-/172	-/282	-/0.1	-/111	ISSR2-8	SSI		
	-/0.52	-/0.11	-/177	ISSR3-1			-/275	-/0.2	-/187	-/187	ISSR9-1			
							-/275	-/0.35	-/598	-/598	ISSR1-6			
							-/261	-/0.06	-/733	-/733	ISS10-8			
							-/262	-/0.06	-/752	-/752	ISSR10-10			
							-/26	-/14	-/560	-/560	ISSR3-1			
-0.151							-/171	-/0.00	-/642	-/642	ISSR2-8	TOL		
							-/174	-/0.01	-/626	-/626	ISSR7-2			

## منابع

- Adboli Mndolkani, B., H. Alami and M. Esfahani 2010. Association analysis for morphological traits in peanut (*Arachis hypogea* L.) using microsatellite markers. Journal of Iran Crop Science, 12: 510-519 (In Persian).
- Bouman, B.A.M. and T.P. Toung. 2001. Field water management to save water and increase productivity in irrigated lowland rice. Agriculture Water Management, 49: 11-30.
- Bouslama, MS. and W.T. Schapaugh. 1984. Stress Tolerance in soybeans. Ievaluation of three screening techniques for heat and drought tolerance. Crop Science, 24: 933.
- Dato Seri, Y.B. 2003. Modernizing the rice farming community to meet social and business needs: The way forward rice conference. 13-16 Oct 2003; Alor, Setar, Kedah, Malaysia, 405 pp.
- Don, R.H., P.T. Cox, B.J. Wainwright and J.S. Mattick. 1991. Touchdown PCR to circumvent spurious priming during gene amplification.Nucleic Acid Research, 19: 4008-4009.
- Ebrahimi, A., M.R. naghvi, M. Sabokdast and A. Moradiy Sarab Shali. 2011. Analysis of microsatellite markers associated with agronomic traits in Iran Barley domesitc. Journal Modern Genetics, 6: 35-43 (In Persian).
- Fernandez, G.C. 1992. Effective selection criteria for assessing plant stress tolerance. Proceeding of the International Symposium on Adaptation of Vegetable and other Food Crops to Temperature and Water Stress. Taiwan, 13-18 August, 257-270 pp.
- Fischer, R.A. and R. Maurer. 1978. Drought resistance in spring wheat cultivars. I. Grain yield responses. Aust. J. Agric. Res, 29: 897-912.
- Flahty Anbaran, M., A.G. Habashi, M. Esfahani, S.A. Mohammad and B. ghar Yazy .2006. Genetic Diversity and Relationships of Diploid and Tetraploid Annual Alfalfa Using microsatellite markers, Journal of Science and Technology of Agriculture and Natural Resources, 10: 42-51 (In Persian).
- Farshadfr, H., M. zamani Matlabi and H. Imam Joma. 2000. Selection for drought tolerance in chickpea lins. Iranian Journal of Agricultural Sciences, 32: 65-77 (In Persian).
- Gavuzzi, P, F. Rizza, M. Palumbo, R.G.Campanile, G.L. Ricciardi and B. Borghi .1997. Evaluation of field andlaboratory predictors of drought and heat tolerance in winter cereals. Canadian Journal of Plant Science, 77: 523-531
- Gilevaei, M D., H. Samizadeh and B. Rabiei. 2018. Evaluation of Path Analysis for Yield and Yield Components in Rice (*Oryza Sativa* L.) Under Normal and Drought Stress Conditions. Journal of Crop Breeding, 24(9): 30-39
- Hormaza, J.I., L. Dollo and V.S. Polito. 1994. Determination of relatedness and geographical movement of *Pistacia vera* (pistachio; Anacardiaceae) germplasm by RAPD analysis. Economical Botany, 48: 349-358.

14. Katouzi, M., S. Navabpour, A. Yamchi, S.S. Ramezanpour 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 discriminant 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. Ziaeibidhendi 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. Acevedo and P. Monneveaux. 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