دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
پژوهشنامه اصلاح گیاهان زراعی

تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های برنج با استفاده از نشان‌گرهای SSR و تجزیه ارتباط برای صفات مرتبط با تحمل به سرما

فاطمه هنرور[۱]، حسین صبوری[۲] و احمدرضا دادرس[۳]

۱- کارشناس ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی واحد دامغان
۲- استادیار، دانشگاه گنبد کاووس، (نویسنده مسوول: hos.sabouri@gmail.com)
۳- دانشجوی دکتری، دانشگاه گیلان

تاریخ دریافت: ۹۲/۷/۲۸ تاریخ پذیرش: ۹۲/۱۲/۱۴

چکیده

به‌منظور بررسی تنوع ژنتیکی و تجزیه ارتباط نشان‌گرهای SSR و صفات مرتبط با تحمل به سرما در برنج، از ۲۲ ژنوتیپ برنج شامل ۱۰ ژنوتیپ بومی و اصلاح شده و ۱۲ ژنوتیپ خارجی و ۲۱ نشان‌گر SSR استفاده شد. در مجموع ۸۹ آلل در جمعیت مشاهده شد. تعداد آلل در هر جایگاه از ۲ تا ۷ متغیر بود. بیشترین تعداد آلل در آغازگر RM8231 و کمترین تعداد آلل در RM119 رؤیت گردید. بیشترین مقدار اطلاعات چندشکلی (۰/۷۴۸۶) مربوط به آغازگر RM8231 و کمترین مقدار (۰/۲۵۷۳) مربوط به آغازگر RM7424 بود. میزان تنوع ژنی، از کمترین مقدار ۰/۲۷۷۷ مربوط به آغازگر RM7424 تا بیشترین مقدار ۰/۷۸ مربوط به آغازگر RM8231 متغیر بود. جایگاه‌های ریزماهواره مورد استفاده چند شکلی نسبتاً بالایی را نشان دادند و این مطلب بیان‌کننده آن است که این جایگاه‌ها قدرت بالایی را در تمایز ژنوتیپ‌ها نشان دادند. تجزیه رگرسیون گام به گام داده‌های SSR و داده‌های فنوتیپی، در مجموع ۱۴ آلل مثبت و آگاهی‌بخش برای صفات طول ریشه، طول ساقه و وزن ساقه در هر دو شرایط نرمال و تحت تنش سرما شناسایی نمود. بالاترین ضریب تبیین به طول ریشه با دو آلل RM1337-A و RM5774-C اختصاص داشت. هم‌چنین هیچ آلل مرتبط با وزن ریشه تحت تنش شناسایی نشد. از نشان‌گرهای آگاهی بخش شناسایی شده در صورتی‌که در آزمایشات بعدی به تأیید برسند می‌توان در برنامه‌های به‌نژادی استفاده نمود.

واژه‌های کلیدی: برنج، تنش سرما، ریزماهواره، نشان‌گر آگاهی‌بخش

مقدمه

برنج یکی از قدیمی‌ترین گیاهان زراعی و با بیش از ده هزارسال قدمت می‌باشد. امروزه برنج غذای اصلی بیش از نصف مردم دنیا است و در بخش غذایی جهان نقش بزرگی دارد (۲). این گیاه با منشاء گرمسیری و نیمه‌گرمسیری، نسبت به دماهای پایین بسیار حساس و رشد و نمو آن در دماهای کمتر از ۱۵ درجه سانتی‌گراد دچار مشکل می‌شود (۳). آن و همکاران (۱) عنوان کردند با توجه به ژنوم کوچک برنج در مقایسه با ژنوم بزرگ گندم، می‌توان امیدوار بود که بتوان از برنج به عنوان یک گیاه مناسب برای مطالعات ژنتیکی مربوط به گندمیان، استفاده نمود و اطلاعات مناسبی برای سایر گیاهان این خانواده استخراج کرد.

سارما و راتی (۱۳) تنوع ژنتیکی ۱۰۶ ژنوتیپ برنج را به وسیله‌ی نشان‌گر ریزماهواره مورد تجزیه و تحلیل قرار دادند. نشان‌گر ریزماهواره، بالاترین سطح چندشکلی از ۸۰ تا ۱۰۰٪ را نشان دادند. در ۳۷ جایگاه، ریزماهواره تعداد ۱۸۱ آلل ردیابی شد. تعداد آلل در هر مکان ژنی از ۲ تا ۱۳ متغیر بود. ارزش PIC از ۰/۴۵ تا ۰/۸۱ متغیر بود. ربانی و همکاران (۱۰) به بررسی ۴۱ رقم برنج از طریق ۳۰ نشان‌گر انتخاب شده از کل ژنوم برنج پرداختند. تعداد ۱۰۴ آلل در کل با ۳۰ نشان‌گر مشاهده شد، که صددرصد چندشکلی داشتند. تعداد آلل تولید شده از طریق هر نشان‌گر بین ۲ تا ۶ متغیر بود. چوآنگ و همکاران (۴) از ۳۲ نشان‌گر ریزماهواره و ۳۶ رقم برنج از کشورهای مختلف برای آنالیز چندشکلی استفاده کردند. ۳۰۶ آلل در ۳۲ جایگاه مشاهده شد. تعداد آلل‌ها در هر لوکوس از ۳ تا ۲۱ متغیر بود. ساجیب و همکاران (۱۱) از ۲۴ نشان‌گر SSR برای تمایز ۱۲ ژنوتیپ برنج برگزیده شده، استفاده کردند. در میان این ۲۴ نشان‌گر، ۹ نشان‌گر ریز ماهواره چندشکلی نشان دادند. سیتارام و همکاران (۱۴) ۳۰ ژنوتیپ برنج را با ۳۵ آغازگر ریزماهواره مورد بررسی قرار دادند. قربانی و همکاران (۵) در پژوهشی که انجام دادند، مشاهده کردند که اثر تنش سرما بر کاهش میزان رشد گیاه از واضح‌ترین پاسخ‌های گیاهان به سرما می‌باشد. بررسی وزن خشک ریشه و ساقه و ارتفاع گیاه دو رقم اوندا و طارم دم‌سیاه - که در این تحقیق مورد بررسی قرار گرفتند- نشان داده است که هر دو رقم تحت تنش سرما با کاهش معنی‌داری همراه بودند که در رقم طارم دم‌سیاه کاهش بیشتری نسبت به رقم اوندا مشاهده شد. تنش‌های محیطی به ویژه تنش سرما روی ویژگی‌های مورفولوژی، آناتومی و فیزیولوژی گیاهان تأثیر می‌گذارند. اهمیت خسارت سرما در مرحله جوانه‌زنی برای تمام برنج کاران شمال کشور

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2025-07-18]

[DOI: 10.18869/acadpub.jcb.8.17.173]

که در فروردین ماه هر سال بذرپاشی می‌نمایند یک مشکل مهم محسوب می‌شود برنج، گیاه حساس به سرما می‌باشد که محصول آن تحت این تنش تا حد زیادی کاهش می‌یابد (۶). با توجه به اهمیت برنج، شناخت ارقام متحمل و مکانیسم دفاعی آن‌ها در مقابل دمای پایین ضروری می‌رسد. هدف از این پژوهش، بررسی تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های برنج از لحاظ نشان‌گرهای ریزماهواره و تجزیه ارتباط بین آلل‌های نشان‌گرهای مورد استفاده و صفات اندازه‌گیری شده تحت تنش سرما به‌منظور شناسایی نشان‌گرهای ریزماهواره آگاهی بخش بود.

مواد و روش‌ها

به‌منظور بررسی تنوع در سطح مولکولی بین ژنوتیپ‌های برنج در شرایط تنش سرما ۲۲ ژنوتیپ برنج شامل ۱۰ ژنوتیپ بومی و اصلاح شده و ۱۲ ژنوتیپ خارجی ارزیابی شدند (جدول ۱).

جدول ۱- لیست اسامی ژنوتیپ‌های برنج مورد مطالعه

شماره	ژنوتیپ	منشأ	شماره	ژنوتیپ	منشأ
۱	IR82590-B-B-90-4	IRRI	۱۲	ND125	IRRI
۲	حسنی	بومی	۱۳	حسن‌سرایی	بومی
۳	Usen	IRRI	۱۴	قصرالدشتی	بومی
۴	IR60080-64A	IRRI	۱۵	عنبربو ایلام	بومی
۵	IR55423-01	IRRI	۱۶	SAFR117	IRRI
۶	بجار	بومی	۱۷	دم‌سرخ	بومی
۷	IR83747-B-B-81-1	IRRI	۱۸	دیلمانی	بومی
۸	طارم منطقه	بومی	۱۹	لاین۳۰	ایرانی اصلاح شده
۹	IR50	IRRI	۲۰	IR77298-14-1-2	IRRI
۱۰	ICMP41	IRRI	۲۱	IR66424-1-2-1-5	IRRI
۱۱	IR83749-B-B-65-1	IRRI	۲۲	دشت	بومی

مواد گیاهی در آزمایشگاه اصلاح نباتات دانشکده کشاورزی دانشگاه گنبد کاووس در قالب طرح کاملاً تصادفی به‌صورت هیدروپونیک در محلول یوشیدا (۱۷) کشت شدند. سپس نیمی از نمونه‌ها در شرایط نرمال و نیم دیگر از نمونه‌ها در شرایط دمایی ده درجه سانتی‌گراد در اتاقک کشت و در شرایط کنترل شده به مدت ۲۱ روز قرار گرفتند. از نمونه‌های نرمال برای تهیه نمونه برگی برای استخراج DNA استفاده شد. هم‌چنین از نمونه‌های نرمال و تحت تنش در مرحله‌ی ۲ تا ۳ برگی نمونه‌برداری صورت گرفت و صفات طول ریشه، طول اندام هوایی، وزن خشک ریشه و اندام هوایی روی آن‌ها اندازه‌گیری شد. در این مطالعه، DNA از برگ‌های جوان با روش CTAB استخراج گردید (۱۲). سپس با ۲۱ جفت آغازگر ریزماهواره‌ای (جدول ۲) که تعدادی از آن‌ها بر اساس اطلاعات موجود در پایگاه داده گرامینه (http://www.gramene.org) به‌عنوان نشان‌گرهای پیوسته به سرما بر پایه مقالات معتبر گزارش شده بودند، تکثیر شد. واکنش‌های زنجیره‌ای پلی‌مراز در تمام جایگاه‌های ریزماهواره‌ای انجام شد و محصولات با استفاده از ژل پلی‌اکریل‌آمید ۶ درصد الکتروفورز شد. برای تجزیه و تحلیل داده‌های ریزماهواره از نرم‌افزارهای PopGene (۱۶) و Power Marker (۳) برای به دست آوردن فواصل ژنتیکی، رسم دندروگرام داده‌های مولکولی و محاسبه PIC استفاده گردید. برای تعیین نشان‌گرهای آگاهی بخش از رگرسیون گام به گام استفاده شد. برای اینکار هر یک از صفات به‌عنوان متغیر وابسته و داده‌های مولکولی (به‌صورت صفر و یک برای عدم وجود و وجود باند) به‌عنوان متغیر مستقل در نظر گرفته شد.

نتایج و بحث

برای تعیین غلظت و کیفیت DNA استخراج شده از الکتروفورز ژل آگارز استفاده شد. و از DNA فاژ لامبدا که غلظت آن مشخص بود، برای تعیین غلظت نمونه‌های DNA استفاده گردید. از نحوه تشکیل نوارها می‌توان به کیفیت DNA استخراج شده پی برد زیرا DNA سالم و با وزن مولکولی زیاد به‌صورت یک نوار واضح و نمونه‌های خرد شده به صورت یک نوار کشیده شده[1] در طول ژل مشاهده خواهند شد.کیفیت DNA را می‌توان با مشاهده شکل نوارها مشخص کرد به‌طوری‌که وجود نوارهای واضح و بدون کشیدگی بیانگر کیفیت خوب DNA است. اگر در فاصله بین نوار و چاهک کشیدگی دیده شود بیانگر آلودگی به وسیله‌ی پروتئین‌ها واگر یک نوار اضافی در زیر ژل و با فاصله از نوار دیده شود حاکی از وجود RNA در نمونه‌ها است (۱۲).

1-Smear

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2025-07-18]

[DOI: 10.18869/acadpub.jcb.8.17.173]

جدول ۲- ویژگی نشان‌گرهای ریزماهواره مورد مطالعه

نشان‌گر	آغازگر معکوس	آغازگر همسو	کروموزوم
RM144	GATGTATAAGATAGTCCC	GTGGACTTCATTTCAACTCG	۱۱
RM276	TCCTCCATCGAGCAGTATCA	CTCAACGTTGACACCTCGTG	۶
RM480	TTCTGCAGTTCAGACAC	(GA)12	۵
RM134	TTTGGTCTACGTGGCGTACA	ATCCTACCGCTGACCATGAG	۷
RM7426	ATAAGGGTACGGGGAACCAG	TGACATGGATCGATCAGCTC	۲
RM8231	CAACACATGATAGCACATGG	GCGTAAGATCTCCCTACCAC	۱
RM416	GACAAATATAAGGGCAGTGTGC	GGTAAATGGACAATCCTATGGC	۳
RM3688	AGCTAGGCAAAGCATGCATG	GTTGAATCAAGCTGTGCAGC	۲
RM11	CTCATCGAATGGACTAGCT	(GA)6 - (GA)16	۷
RM3475	TTCCTCGGTGTATGGGTCTC	GTCGGTTTGCCTAGTTGAGC	۱
RM6589	CGACGCTGTTGATCAGCC	AAGTTCACAACACGTCGTCG	۴
RM7424	TCAAGCTAGCCACACAGCTG	AGAAGCCCATCTAGCAGCAG	۹
RM119	GTCAGGCTTCTGCCATTCTC	CATTGGAGTGGAGGCTGG	۴
RM5720	GAGAGTAGGAGTTGATAACA	CCTGATAAATTGACAGTTAC	۷
RM152	CTTTCGAATCTGAAGATC	TACACCTCATCGATCAATCG	۸
RM4455	GAGAAGGTATGATAACCAAT	CTCTCAAAGAACTAGGACTC	۱۰
RM1337	ACCATAGGAAGATCATCACA	GCTGAGGAGTATCCTTTCTC	۱۲
RM5371	ACCCAGATCGAAACAACTGC	GGCTAGCTTTAGCTGCGTTG	۶
RM4160	CGGCTTAGTTCAATTGGACC	CGGCTTAGTTCAATTGGACC	۳
RM5774	CTTTCATAATTCTAGCTTA	CTTTCATAATTCTAGCTTA	۵
RM5702	ATTGGACACGTACATAATAA	TGGGATAAATAGAAAAGTCT	۹

IRRI: International Rice Research Institute

نمونه‌هایی که کیفیت DNA آن‌ها پایین بود، مجدداً استخراج شدند. تعیین غلظت و کیفیت DNA به‌صورت زیر انجام شد:

۱- برای تعیین کمیت و کیفیت DNA ژنومی از ژل آگارز ۰/۷ درصد تا ۱ درصد استفاده شد. برای تهیه زل آگارز مقدار آگارز وزن گردید و در ۱۰۰ میلی‌لیتر بافر TBE۱X، ریخته شد. ارلن حاوی مخلوط آگارز و بافر به مدت ۲ تا ۳ دقیقه در مایکروفر گذاشته شد. پس از جوشیدن و شفاف شدن، ارلن از مایکروفر بیرون آورده شد و روی شیکر قرار داده شد تا حباب‌ها از ژل خارج شوند. در این زمان ابتدا ظرف ژل روی یک سطح تراز قرار گرفت، تا ضخامت ژل در تمام نواحی یکسان شود و از بروز انحراف در مسیر ژل جلوگیری شود. همچنین دو طرف ظرف ژل توسط چسب نواری بسته شد تا از خروج ژل جلوگیری شود. برای ایجاد چاهک درون ژل شانه‌ها روی سینی با فاصله مناسب و به‌صورت کاملاً راست قرار گرفتند. زمانی‌که دمای ژل به دمای دست نزدیک شد در سینی ژل ریخته شد. بعد از این که ژل آگارز بسته شد، چسب‌های دو طرف سینی باز شده و ژل به آرامی درون تانک الکتروفورز قرار گرفت. پس از چند دقیقه شانه ها به آرامی بیرون کشیده شدند.

۲- نمونه‌های تهیه شده در چاهک‌های ژل بارگذاری شدند و یکی از چاهک‌ها به DNA لاندا اختصاص داده شد. برای بارگذاری نمونه‌ها از نسبت‌های DNA (۵ میکرولیتر) و محلول رنگی بارگذاری[1] (۲ میکرولیتر) استفاده شد. محلول رنگی بارگذاری به‌صورت ۶X (۶ برابر) تهیه شد. DNA لاندا با غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ نانوگرم نیز برای اندازه‌گیری غلظت DNA برای مقایسه با DNA مورد نظر بارگیری شد.

۳- پس از آن که تانک‌های دستگاه الکتروفورز به وسیله بافر الکترود (TBE 1X) پر شدند، دستگاه الکتروفورز به دستگاه تأمین‌کننده برق[2] (Consort E455) متصل شد و الکتروفورز با ولتاژ ثابت ۶۰ ولت انجام گرفت. وقتی که نوار رنگی پیشرو به حدود ۲ سانتی‌متری انتهای ژل رسید، جریان برق قطع شد و ژل برای رنگ‌آمیزی از دستگاه الکتروفورز خارج شد.

۴- رنگ‌آمیزی ژل در تشتک حاوی محلول ۰/۵ میکروگرم در میلی‌لیتر اتیدیوم[3] بروماید به مدت ۲۰ دقیقه انجام شد.

۵- پس از اتمام رنگ‌آمیزی، به‌منظور عکس‌برداری، ژل به دستگاه ژل داک[4] (Bio-RAD, 2000) منتقل شد.

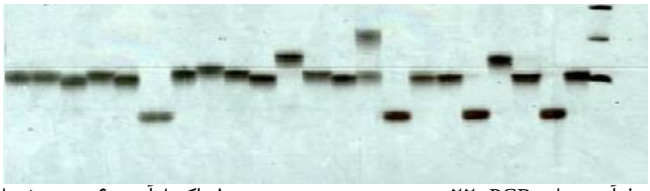
۶- پس از مقایسه نمونه‌های DNA با شاهد (DNA لاندا)، غلظت هر یک از آن‌ها به‌عنوان محلول مادری DNA ژنومی در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد در فریزر نگهداری شدند. نتایج نشان داد که DNAهای به دست آمده دارای کیفیت مناسبی برای انجام واکنش‌های PCR بوده‌اند. شکل (۱) تصویری از ژل اکریل‌آمید حاوی فرآورده‌های تکثیر شده نمونه DNA، ۲۲ ژنوتیپ مورد مطالعه با آغازگر RM276 را نشان می‌دهد. با بارگذاری فرآورده‌های PCR روی ژل اکریل‌آمید تفاوت آلل‌های ریزماهواره بهتر مشاهده گردید. در این مطالعه، از ۲۱ جفت آغازگر، در مجموع

1- Dye 2-Power Supply 3- Ethidium Bromide 4-Gel Documentation

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2025-07-18]

[DOI: 10.18869/acadpub.jcb.8.17.173]

۸۹ آلل مشاهده شد. تعداد آلل در هر جایگاه از ۲ تا ۷ متغیر بود که به‌طور متوسط ۴/۲ می‌باشد. بیشترین تعداد آلل در آغازگر RM8231 و کمترین تعداد آلل در RM119 مشاهده شد (جدول۳). در تحقیق لین و همکاران (۸) از ۱۱۴ توالی ساده تکراری در ریزماهواره ۳۹۵ آلل مشاهده شد.



شکل ۱- تصویر فرآورده‌های PCR، ۲۲ ژنوتیپ مورد بررسی روی ژل اکریل‌آمید ۶ درصد (نشان‌گر RM276).

ساجیب و همکاران (۱۱) از ۲۴ نشان‌گر SSR برای تمایز ۱۲ ژنوتیپ برنج برگزیده شده، استفاده کردند. تعداد آلل در هر لوکوس از ۲ آلل (در نشان‌گرهای RM277, RM244, RM510) تا ۶ آلل (RM163) متغیر بودند. بیشترین مقدار اطلاعات چندشکلی (۰/۷۴۸۶) مربوط به آغازگرRM8231 و کمترین مقدار (۰/۲۵۷۳) مربوط به آغازگر RM7424 بود و میانگین شاخص چندشکلی کل ۰/۵۵ به دست آمد (جدول ۳).

جدول ۳- آنالیز تنوع ژنتیکی ۲۱ نشان‌گر ۲۲ ژنوتیپ برنج

شماره	نشان‌گر	تعدادآلل	فرآوانی آلل	تنوع ژنی	PIC
۱	RM144	۳	۰/۵۲	۰/۵۷۶۲	۰/۴۹۱۸
۲	RM276	۵	۰/۳۳	۰/۷۶۳۹	۰/۷۲۶۰
۳	RM5371	۳	۰/۴۷	۰/۶۲۵۹	۰/۵۵۰۹
۴	RM480	۴	۰/۵۹	۰/۵۸۲۶	۰/۵۳۳۲
۵	RM134	۴	۰/۵	۰/۵۷۸۵	۰/۴۹۱۴
۶	RM7426	۶	۰/۳۳	۰/۷۷۵۵	۰/۷۴۱۴
۷	RM8231	۷	۰/۳۳	۰/۷۸	۰/۷۴۸۶
۸	RM416	۴	۰/۷۲	۰/۴۴۴۴	۰/۴۰۸۷
۹	RM3688	۵	۰/۴	۰/۷۴	۰/۷۰۱۴
۱۰	RM11	۳	۰/۴	۰/۶۶	۰/۵۸۶۲
۱۱	RM3475	۴	۰/۶۸	۰/۴۹۱۷	۰/۴۵۰۷
۱۲	RM6589	۶	۰/۴۰	۰/۷۳۵۵	۰/۶۹۷۴
۱۳	RM7424	۳	۰/۸۴	۰/۲۷۷۰	۰/۲۵۷۳
۱۴	RM119	۲	۰/۸۰	۰/۳۲	۰/۲۶۸۸
۱۵	RM5720	۵	۰/۴۰	۰/۷۲	۰/۶۷۳۹
۱۶	RM152	۳	۰/۴۵	۰/۵۷۸۵	۰/۴۸۶۳
۱۷	RM5702	۵	۰/۴۲	۰/۷۲۵۶	۰/۶۸۶۹
۱۸	RM4455	۳	۰/۷۷	۰/۳۶۷۸	۰/۳۲۵۷
۱۹	RM1337	۴	۰/۵۴	۰/۶۱۵۷	۰/۵۶۰۳
۲۰	RM4160	۵	۰/۶۱	۰/۵۸۶۴	۰/۵۵۵۳
۲۱	RM5774	۵	۰/۴۲	۰/۶۹۳۹	۰/۶۴۱۹
	میانگین	۴/۲۳۸۱	۰/۵۲	۰/۶۰۱۹	۰/۵۵۱۶

یاسمین و همکاران (۱۵) با بررسی تنوع ژنتیکی ۲۴ ژنوتیپ برنج با ۱۰۰ نشان‌گر ریزماهواره ارزش PIC را از ۰/۵۸ (RM38) تا ۰/۹۲ (RM1024) گزارش نمودند. تنوع درون جمعیتی یا تنوع ژنی که در این مطالعه، از کمترین مقدار ۰/۲۷۷۷ مربوط به آغازگر RM7424 تا بیشترین مقدار ۰/۷۸ مربوط به آغازگر RM8231، متغیر بود. در این مطالعه تنوع ژنی به‌طور متوسط ۰/۶ بوده است (جدول ۳). یاسمین و همکاران (۱۵) تنوع ژنتیکی ۲۴ رقم برنج را با ۱۰۰ نشان‌گر ریزماهواره مورد بررسی قرار دادند. تنوع ژنی بین ۰/۶۳۲۲ (RM38) تا ۰/۹۳۱۰ (RM495 و RM1024) بود. ماتریس فاصله ژنتیکی با استفاده از نرم‌افزار Power Marker بر اساس فرمول اصلاح شده نی محاسبه شد. ماتریس حاصل از تجزیه داده‌های مولکولی نشان داد که فاصله ژنتیکی میان ارقام در محدوده از ۰/۲۶ تا ۱ متغیر بود. محدوده فاصله ژنتیکی نشان‌دهنده تنوع بالای موجود در سطح ژنوم ژنوتیپ‌های مورد مطالعه می‌باشد. در بین ژنوتیپ‌های مورد مطالعه ژنوتیپ‌های حسنی و Usen با یک‌دیگر در کمترین فاصله و ژنوتیپ‌های حسن سرایی و IR50 با یک‌دیگر در بیشترین فاصله قرار داشتند (جدول ۴). در مطالعه یاسمین و همکاران (۱۵) فاصله ژنتیکی همه ژرم‌پلاسم‌ها را از ۰/۴۹ تا ۰/۹۰ و فاصله ژنتیکی لاین‌های اینبرد را از ۰/۴۹ (بین FL478 و FL378) تا ۰/۸۷ (بین BR10 و BRRI) عنوان کردند.

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2025-07-18]

[DOI: 10.18869/acadpub.jcb.8.17.173]

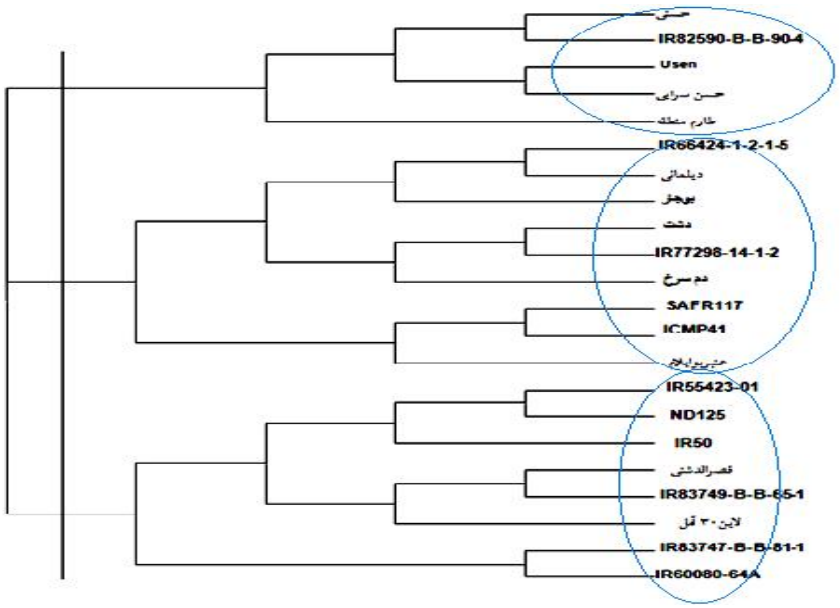
جدول ۴- فاصله ژنتیکی بین ژنوتیپ‌های برنج

	دشت	IR82590-B-B-90-4	حسنی	Usen	IR60080-64A	IR55423-01	بجار	IR83747-B-B-81-1	طارم منطقه	IR50	ICMP41	IR83749-B-B-65-1	ND125	حسن‌سرایی	قصرالدشتی	عنبربو ایلام	SAFR117	دم‌سرخ	دیلمانی	لاین ۳۰	IR77298-14-1-2	IR66424-1-2-1-5
IR82590-B-B-90-4	۰/۸۳																					
حسنی	۰/۵	۰/۳۱																				
Usen	۰/۵۵	۰/۴۳	۰/۲۶																			
IR60080-64A	۰/۶۴	۰/۵	۰/۶۱	۰/۴۷																		
IR55423-01	۰/۷۶	۰/۸	۰/۶۲	۰/۶۶	۰/۸۱																	
بجار	۰/۴۶	۰/۸۱	۰/۶۳	۰/۶۱	۰/۶۶	۰/۸۲																
IR83747-B-B-81-1	۰/۸	۰/۵	۰/۵۷	۰/۶۱	۰/۳۸	۰/۹۴	۰/۷															
طارم منطقه	۰/۶	۰/۴۷	۰/۴	۰/۳۶	۰/۵	۰/۷۶	۰/۷۵	۰/۷														
IR50	۰/۸۴	۰/۶۸	۰/۸۲	۰/۸۸	۰/۷۳	۰/۷۸	۰/۸۸	۰/۷۶	۰/۸۳													
ICMP41	۰/۶	۰/۴۳	۰/۳۸	۰/۳۸	۰/۴۷	۰/۸۱	۰/۶۱	۰/۵۵	۰/۵۲	۰/۷۶												
IR83749-B-B-65-1	۰/۵۷	۰/۵۶	۰/۴۷	۰/۵۷	۰/۵۲	۰/۷۳	۰/۶۶	۰/۷۲	۰/۴۷	۰/۷۰	۰/۵											
ND125	۰/۹	۰/۶۱	۰/۶۹	۰/۶۱	۰/۸۴	۰/۷۱	۰/۸۵	۰/۶۴	۰/۶۴	۰/۸۳	۰/۷۸	۰/۸۴۶										
حسن‌سرایی	۰/۷۱	۰/۵۷	۰/۳۸	۰/۳۵	۰/۶۴	۰/۶۶	۰/۶۱	۰/۶۶	۰/۶۱	۱	۰/۴۳	۰/۸۴۵	۰/۸۳									
قصرالدشتی	۰/۶۴	۰/۷۱	۰/۴۷	۰/۵۸	۰/۵۸	۰/۶	۰/۶۴	۰/۵۸	۰/۵۲	۰/۸	۰/۶۴	۰/۴۱	۰/۶۹	۰/۵۶								
عنبربو ایلام	۰/۴۶	۰/۵۲	۰/۵۲	۰/۵۲	۰/۶۴	۰/۶۸	۰/۵۷	۰/۶۸	۰/۶	۰/۷۷	۰/۳۶	۰/۵۲۶	۰/۸۵	۰/۶۴	۰/۵۸							
SAFR117	۰/۵۷	۰/۵۷	۰/۳۵	۰/۵۲	۰/۵	۰/۶۴	۰/۶۲	۰/۴۳	۰/۵۲	۰/۸	۰/۲۳	۰/۵۲۹	۰/۸۳	۰/۴۶	۰/۴۳	۰/۴۱						
دم‌سرخ	۰/۲۸	۰/۶	۰/۴۴	۰/۵۸	۰/۵	۰/۶۲	۰/۶۶	۰/۷۲	۰/۶۸	۰/۶۸	۰/۵۵	۰/۵۲۹	۰/۶۹	۰/۶۸	۰/۶۲۵	۰/۵	۰/۴۳					
دیلمانی	۰/۸	۰/۷۳	۰/۶۶	۰/۷۰	۰/۷۲	۰/۷۰	۰/۵۲	۰/۷۳	۰/۸۴	۰/۹۳	۰/۷۲	۰/۷۶	۰/۶۴	۰/۵۸	۰/۷۶	۰/۶۶	۰/۶۸	۰/۶۱				
لاین ۳۰	۰/۹۲	۰/۸	۰/۸۱	۰/۷۳	۰/۶	۰/۷۵	۰/۷۶	۰/۶۴	۰/۶۴	۰/۷۱	۰/۷۳	۰/۵۳	۰/۶۹	۰/۷۵	۰/۵	۰/۷۵	۰/۶۱	۰/۸	۰/۷۵			
IR77298-14-1-2	۰/۴	۰/۷۱	۰/۶۸	۰/۷۵	۰/۶۸	۰/۶۶	۰/۷۶	۰/۸۲	۰/۷۰	۰/۸	۰/۷۶	۰/۶۸	۰/۶۹	۰/۸	۰/۷۵	۰/۵۲	۰/۶۸	۰/۵	۰/۷۶	۰/۷۱		
IR66424-1-2-1-5	۰/۵۳	۰/۷۵	۰/۶۶	۰/۵۵	۰/۵۸	۰/۸۱	۰/۶۳	۰/۷۳	۰/۶۳	۰/۸۲	۰/۶۶	۰/۷۲	۰/۷۱	۰/۷۰	۰/۷۶	۰/۷۰	۰/۵۶	۰/۴۷	۰/۵	۰/۶۸	۰/۵۸	
دشت		۰/۸۳	۰/۵	۰/۵۷	۰/۶۴	۰/۷۶	۰/۴۶	۰/۸	۰/۶	۰/۸۴	۰/۶	۰/۵۷	۰/۹۰	۰/۷۱	۰/۶۴	۰/۶۳	۰/۵۷	۰/۲۸	۰/۸	۰/۹۲	۰/۴	۰/۵۳

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2025-07-18]

[DOI: 10.18869/acadpub.jcb.8.17.173]

گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها برای داده‌های مولکولی بر اساس روش UPGMA و ضریب تشابه جاکارد، ژنوتیپ‌های مورد مطالعه را در سه گروه قرار داد (شکل ۲).



شکل ۲- تجزیه خوشه‌ای اطلاعات مولکولی ژنوتیپ‌های مورد مطالعه بر اساس روش UPGMA و ضریب تشابه جاکارد.

نقطه برش دندروگرام با استفاده از تجزیه تابع تشخیص انجام شد. تجزیه تابع تشخیص با استفاده از این سه گروه نشان داد که تابع اول ۶۵/۲ درصد و تابع دوم ۲۴/۸ درصد از تغییرات کل را توجیه می‌کنند (به ترتیب با کای اسکوئر ۱۲۱/۱۷۵** و ۵۵/۲۳۵**). با توجه دقیق‌تر به نتایج حاصل، می‌توان اذعان داشت که تعدادی از ژنوتیپ‌های گروه اول جزء ژنوتیپ‌های حساس و تعدادی از ژنوتیپ‌های گروه سوم ژنوتیپ‌های متحمل‌تر به سرما بودند. در حقیقت، نشان‌گرهای SSR به کار رفته تا حدودی توانستند این ژنوتیپ‌ها را از هم تفکیک نمایند. لذا انتظار می‌رود بتوان با استفاده از نتایج تجزیه ارتباط به نشان‌گرهایی دست یافت که ارتباط معنی‌داری با صفات مرتبط با تحمل به سرما داشته باشند. کومار و همکاران (۷) با استفاده از تجزیه و تحلیل خوشه‌ای، سطح بالایی از تنوع ژنتیکی را در میان ژنوتیپ‌ها تشخیص دادند و ضریب تشابه در مطالعه آنها از ۰/۴ تا ۰/۹ متغیر بود.

از آنجا که جایگاه‌های ریزماهواره مورد استفاده دارای چند شکلی بالایی بوده و انتخاب این جایگاه‌ها به خوبی صورت گرفته است و از طرفی تعدادی از نشان‌گرهای مورد بررسی از جمله RM276، RM7426، RM8231، RM3688، RM6589، RM5720، RM5702 و RM5774 توانستند تنوع در ژنوتیپ‌های برنج را به میزان بالایی نشان دهند.

بر اساس تجزیه رگرسیون داده‌های SSR و صفات مورفولوژیکی، در مجموع ۱۴ آلل مثبت برای صفات طول ریشه، طول ساقه و وزن ساقه شناسایی شد (جدول ۵). از بین صفات مورد مطالعه، فقط برای صفت وزن ریشه، نشان‌گرهای مثبت وجود نداشت. مقادیر ضرایب تبیین تصحیح شده نشان داد که برای صفات طول ریشه در شرایط نرمال و تنش، طول ساقه و وزن ساقه در شرایط نرمال بیش از ۴۰ درصد تغییرات توسط آلل نشان‌گرهای مثبت شناسایی شده توجیه گردید. آلل RM152-B دارای رابطه معنی‌داری با طول ساقه و وزن ساقه در شرایط نرمال، آلل RM5774-C برای صفت طول ریشه در شرایط نرمال و تنش به‌طور مشترک رابطه معنی‌دار نشان داد. صفت طول ساقه در شرایط نرمال دارای بیشترین میزان تغییرات تبیین شده (۰/۷۵۹) بود و وزن ریشه در شرایط نرمال دارای کمترین میزان تغییرات تبیین شده (۰/۱۹۸) توسط آلل‌ها بود.

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2025-07-18]

[DOI: 10.18869/acadpub.jcb.8.17.173]

جدول ۵- ضرایب رگرسیون و ضریب تبیین تصحیح شده به روش گام به گام بین هر یک از صفات به‌عنوان متغیر وابسته و نشان‌گرها به‌عنوان متغیر مستقل

		ضرایب رگرسیون صفات							
		طول ریشه		طول ساقه		وزن ریشه		وزن ساقه	
	نشان‌گرها	نرمال	تنش	نرمال	تنش	نرمال	تنش	نرمال	تنش
	عرض از مبدا	۱۶/۹۷۸	۱۴/۸۹۱	۱۱/۸۰۷	۹/۲۸۴	۰/۰۸۷		۰/۰۸۸	۰/۰۴۱
	R^2 تصحیح شده	۰/۴۲۸	۰/۴۸۵	۰/۷۵۹	۰/۲۵۶	۰/۱۹۸		۰/۵۰۶	۰/۳۹۵
۱	RM480-A							۰/۰۲۱	
۲	RM7426-D			-۱/۲۷۸					
۳	RM7426-E			۰/۹۷					
۴	RM3688-D				-۱/۸۴۹				
۵	RM3475-C								۰/۰۰۱
۶	RM6589-F								-۰/۰۰۸
۷	RM119-A	۰/۲۷۹							
۸	RM119-B					۰/۰۰۳			
۹	RM152-B			-۱/۶۵۳				-۰/۰۲۳	
۱۰	RM4455-C			۴/۳۹۷					
۱۱	RM1337-A		۲/۷۶۷						
۱۲	RM5774-C	۲/۹۰۹	۱/۷۳۸						

منابع

1. Ahn, S., J.A. Anderson, M.E. Sorrells and S.D. Tank. 1993. Homologous relations of rice, wheat and maize chromosomes. Molecular and General Genetics, 241: 483-490.
2. Akhgari, H. 2004. Rice (Agriculture, Regrowth Nutrition). Rahst Islamic Azad university's publications, 481 pp.
3. Allen, D.J. and D.R. Ort. 2001. Impacts of chilling temperatures on photosynthesis in warm-climate plants. Trends in Plant Science, 6: 36-42.
4. Chuang, H.Y., S.H. Lur, K.K. Hwu and M.C. Chang. 2011. Authentication of domestic Taiwan rice varieties based on fingerprinting analysis of microsatellite DNA markers. Botanical Studies, 52: 393-405.
5. Ghorbani, A., F. Zarinkamar and A. Fallah. 2009. The Effect of cold stress on the morphologic and physiologic characters of two rice varieties in seedling stage. Journal of Crop Breeding, 1: 50-66 (In Persian).
6. Ghorbani, A., F. Zarinkamar and A. Fallah. 2011. Effect of Cold Stress on the Anatomy and Morphology of the Tolerant and Sensitive Cultivars of Rice during Germination. Journal of Cell and Tissue, 2: 235-244 (In Persian).
7. Kumar, R., A. Kumar, S.A. Kumar and J. Radha. 2012. Evaluation of genetic diversity in rice using simple sequence repeats (SSR) markers, African Journal of Biotechnology, 11: 14956-14995.
8. Lin, M.A., Y.U. Xian-quan and Z. Fu-sheng. 2010. SSR-Based Analysis on Genetic Diversity of Rice Landraces from Guizhou Province, China. Chinese Journal of Rice Science, 24: 237-243.
9. Liu, K. and S.V. Muse. 2005. Power Marker: an integrated analysis environment for genetic marker analysis. Bioinformatics, 21: 2128-2129.
10. Rabbani, M.A., M.S. Masood, Z.K. Shinwari and K. Yamaguchi-Shinozaki. 2010. Genetic analysis of basmati and non-basmati Pakistani rice (*Oryza sativa* L.) cultivars using microsatellite markers. Pakistan Journal of Botany, 42: 2551-2564.
11. Sajib, A.M., M.D. Musharaf Hossain, A.T.M.J. Mosnaz, H. Hossain, M.D. Monirul Islam, M.D. Shamsher Ali and S.H. Prodhan. 2012. SSR marker-based molecular characterization and genetic diversity analysis of aromatic landreces of rice (*Oryza sativa* L.) Journal of Bioscience and Biotechnology, 1: 107-116.
12. Saghai Maroof, M.A., R.M. Biyashev, G.P. Yang, Q. Zhang and R.W. Allard. 1994. Extraordinarily polymorphic microsatellites DNA in barely species diversity chromosomal location and population dynamics. Proceeding of the Academy of sciences, USA, 91: 5466-5570.
13. Sarma, R.N. and S. Rathi. 2012. Microsatellite diversity in indigenous glutinous rice landraces of Assam. Indian Journal of Biotechnology, 11: 23-29.
14. Seetharam, K., S. Thirumeni and K. Paramasivam. 2009. Estimation of genetic diversity in rice (*Oryza sativa* L.) genotypes using SSR markers and morphological characters. African Journal of Biotechnology, 8: 2050-2059.
15. Yasmin, F., M.R. Islam, S. Rehana, R.R. Mazumder, M. Anisuzzaman, H. Khatun, R. Rayhan and G.B. Gregorio. 2012. Molecular characterization of inbred and hybrid rice genotypes of Bangladesh. SABRAO Journal of Breeding and Genetics, 44: 163-175.
16. Yeh, F.C. R.C. Yang and T. Boyle. 1999. PopGene, version 1.31. Microsoft windows based Freeware for population genetic analysis. Molecular Biology and Technology Center, University of Alberta, Edmonton. AB. Canada, 26 pp.
17. Yoshida, S., D.A.J.H. Forno Cock and K.A. Gomez. 1976. Laboratory manual for physiological studies of rice 3rd Ed). International Rice Research Institute, pp: 27-35.

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2025-07-18]

[DOI: 10.18869/acadpub.jcb.8.17.173]

Study of Genetic Diversity of Rice Genotypes by SSR Markers and Association Analysis for Related Traits to Cold Tolerance

Fatemeh Honarvar[1], Hossein Saoburi[2] and Ahmad Reza Dadras[3]

1- M.Sc., Islamic Azad University, Damghan Branch
2- Assistant Professor, University of Gonbad Kavous, (Corresponding author: hos.sabouri@gmail.com)
3- Ph.D. Student, University of Guilan
Received: October 20, 2013 Accepted: March 5, 2014

Abstract

In order to investigate of genetic diversity and association analysis SSR markers and related traits to cold tolerance in rice, 22 rice genotypes including 10 landrace and improved and 12 foreign genotypes and 21 SSR markers were used. In total, 89 alleles were found. The number of alleles at each locus ranged from 2 to 7. The highest number of alleles was observed in primer RM8231 and minimum number of alleles in primer RM119. The maximum of polymorphic information content (0.7486) was related to RM8231 and the lowest (0.2573) was related to RM7424. The gene diversity rate varied between the lowest value is 0.2777 (RM7424) to the maximum value 0.78 to (RM8231). The used microsatellites revealed relatively high polymorphism and suggest theses loci have high potential in distinction of genotypes. The association analysis based on stepwise regression of SSR data and phenotypic data identified totally 14 positive and informative alleles for length and weight of root and stem under normal and stress condition. The highest coefficient and determination under stress was found for root length with two alleles of RM1337-A and RM5774-C. Also no alleles were detected associated with root weight under stress. The identified informative markers in the present study can be used for breeding projects if confirmed in subsequent experiments.

Keywords: Cold Stress, Informative Marker, Microsatellite, Rice

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2025-07-18]

[DOI: 10.18869/acadpub.jcb.8.17.173]