Sari Agriculture Sciences and Natural Resources University

Journal of Crop Breeding Vol. 15, No 47, Autumn 2023 p: 186-194

OPEN ACCESS

"Research Paper"

Phenotypic and Molecular Screening of Different Genotypes of Rice based on the Markers Related to the Aroma Trait

Zeynab Yousefi[1], Khadijeh Bagheri [2], Mostafa Modarresi[3] and Noraddin Hosseinpour Azad [4]

1- Department of Plant Production and Genetics, Faculty of Agriculture, University of Zanjan, Zanjan, Iran.
2- Department of Plant Production and Genetics, Faculty of Agriculture, University of Zanjan, Zanjan, Iran.
3- faculty member of Rice Research Institute of Iran, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Rasht, Iran. (Corresponding author: m.modaresi@areeo.ac.ir)
4- Department of Plant Sciences and Medicinal Plants, Mashgin -Shahr Faculty of Agriculture, University of Mohaghegh Ardabili , Iran

Received: 20 December, 2022 Accepted: 15April, 2023

Extended Abstract

Introduction and Objective: Grain quality is one of the most important goals of rice breeding. One of the important traits in rice grain quality is its aroma, which is the result of the expression of recessive mutations of the OsBadh2 gene and determines the economic value of rice. In this research, the phenotypic and molecular screening of 50 different genotypes of rice was done based on the markers related to the aroma trait.

Materials and Methods: In this research, 50 local and improved genotypes of rice were prepared from the collection of the Rice Research Institute of Iran, and the aroma trait was based on biochemical evaluation related to phenotypic selection based on the intensity of the aroma created in the treatment with 1.7 potassium hydroxide solution percentage and genotypic selection were done based on the band pattern created from the amplified gene sequence by using 3 pairs of specific primers (Badh2, Badex7-5 and Nksbad2) contiguous with the gene locations controlling the scent trait. To analyze the correlation between genes and the observed phenotype, the generalized linear logistic regression model was used.

Results: Based on phenotypic evaluation, 31 aromatic cultivars and 19 non-aromatic cultivars were identified, which were in full agreement with the data obtained from genotypic screening, and it was found that Badh2 and Nkshad2 markers are able to predict and distinguish aromatic and non-aromatic cultivars with high confidence and accuracy.

Conclusion: Badh2 and Nksbad2 markers can be used as efficient markers in genetic localization of diverging populations for fragrance as a Codominant marker instead of a phenotypic evaluation method.

Keywords: Aroma trait, Grain quality, Genetic screening, Rice genotype

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-05-31]

[DOI: 10.61186/jcb.15.47.186]

دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

"مقاله پژوهشی"

غربالگری فنوتیپی و مولکولی ژنوتیپ‌های مختلف برنج بر اساس نشانگرهای مرتبط با صفت عطر

زینب یوسفی[۱]، خدیجه باقری[۲]، مصطفی مدرسی[۳] و نورالدین حسین‌پور آزاد[۴]

۱- گروه تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان، ایران
۲- گروه تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان، ایران
۳- هیأت علمی موسسه تحقیقات برنج کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، رشت، ایران، (نویسنده مسوول: m.modaresi@areeo.ac.ir)
۴- گروه علوم گیاهی و گیاهان دارویی، دانشکده کشاورزی مشگین‌شهر، دانشگاه محقق اردبیلی، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۹/۲۹ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۱/۲۶
صفحه: ۱۸۶ تا ۱۹۴

چکیده مبسوط

مقدمه و هدف: کیفیت دانه یکی از اهداف بسیار مهم اصلاح برنج است. از صفات مهم در کیفیت دانه برنج، عطر آن است که حاصل بیان جهش‌های مغلوب ژن OsBadh2 بوده و ارزش اقتصادی برنج را تعیین می‌کند. در این تحقیق به غربالگری فنوتیپی و مولکولی ۵۰ ژنوتیپ مختلف برنج بر اساس نشانگرهای مرتبط با صفت عطر پرداخته شد.

مواد و روش‌ها: در این پژوهش ۵۰ ژنوتیپ محلی و اصلاح شده برنج از کلکسیون مؤسسه تحقیقات برنج کشور تهیه شده و صفت عطر بر پایه ارزیابی بیوشیمیایی مرتبط با گزینش فنوتیپی بر اساس شدت عطر ایجاد شده در تیمار با محلول هیدروکسید پتاسیم ۱/۷ درصد و گزینش ژنوتیپی بر پایه الگوی باندی ایجاد شده حاصل از توالی ژنی تکثیر یافته با بکارگیری ۳ جفت آغازگر اختصاصی (Badh2، Badex7-5 و Nksbad2) پیوسته با مکان‌های ژنی کنترل کننده صفت عطر انجام پذیرفت. برای تحلیل همبستگی میان ژن‌ها و فنوتیپ مشاهده شده، از مدل خطی تعمیم‌یافته رگرسیون لجستیک استفاده شد.

یافته‌ها: بر اساس ارزیابی فنوتیپی، ۳۱ رقم عطری و ۱۹ رقم غیر عطری شناخته شدند که با داده‌های حاصل از غربالگری ژنوتیپی مطابقت کامل داشتند، و مشخص گردید که نشانگرهای $Badh_2$ و $Nkshad_2$ با اطمینان و دقت بسیار بالا قادر به پیش‌بینی و متمایز کردن ارقام عطری و غیر عطری هستند.

نتیجه‌گیری: نشانگرهای $Badh_2$ و $Nksbad_2$ می‌توانند بعنوان نشانگر کارآمد در مکان‌یابی ژنی جمعیت‌های در حال تفرق برای عطر به‌عنوان یک نشانگر همبارز به‌جای روش ارزیابی فنوتیپی مورد استفاده قرار گیرند.

واژه‌های کلیدی: ژنوتیپ برنج، صفت عطر، کیفیت دانه، غربالگری ژنتیکی

مقدمه

برنج یکی از مهم‌ترین اقلام غذایی دنیا بوده و تغذیه نیمی از جمعیت جهان به آن وابسته است. برنج ارزش غذایی بالایی دارد و ۳۵ درصد از کل انرژی دریافتی و حدود ۲۸ درصد از پروتئین مورد نیاز بدن را تأمین می‌کند. همچنین برنج منبع مهم پروتئین بوده و حاوی ۸ نوع اسید آمینه ضروری است (Peng *et al*., 2021). برنج برخلاف سایر غلات اصلی (مانند گندم و ذرت) مستقیماً به مصرف انسان می‌رسد، بنابراین کیفیت و بازارپسندی آن برای تولیدکننده و مصرف‌کننده مهم است (Hussain *et al*., 2020). تقاضا برای برنج معطر به حدی است که گونه‌های معطر اغلب سود بیشتری برای تولیدکنندگان نسبت به برنج غیر معطر دارد (Jin *et al*., 2003). صفات مهم در کیفیت پخت و خوراک برنج شامل عطر و طعم، میزان آمیلوز، قوام ژل و دمای ژلاتینه شدن است (Allah gholipour *et al*., 2010). به‌نژادی سنتی روشی زمانبر، پرهزینه و با کارایی پایین می‌باشد. از معایب اصلی این روش عدم امکان بررسی صفات غیر قابل مشاهده (مانند عطر دانه برنج) در نسل‌های اولیه جمعیت اصلاحی، عدم امکان شناسایی گیاهان واجد ژن‌های مطلوبی که به صورت مغلوب به ارث می‌رسند (در نسل‌های اولیه) و نیز عدم تظاهر مناسب صفات و در نتیجه عدم امکان انتخاب در روش توسعه سریع نسل‌ها می‌باشد. در سال‌های اخیر رشد و استفاده از فن‌آوری مولکولی باعث کاهش هزینه و زمان و افزایش سرعت و دقت پروژه‌های به نژادی شده و انقلابی در برنامه‌های اصلاح نباتات ایجاد کرده است (Lau *et al*., 2015). طی سال‌های گذشته از نسل‌های مختلف نشانگرهای مولکولی مانند نشانگرهای چندشکلی طولی قطعات تکثیریافته (AFLP)، چندشکلی طولی قطعات برش‌یافته (RFLP)، توالی‌های تکراری ساده (SSR) و چندشکلی قطعات DNA تکثیریافته تصادفی (RAPD) استفاده شده است. با این حال، این نشانگرهای DNA به طور تصادفی از مکان‌های چندشکلی ژنوم مشتق می‌شوند، و برخی از آنها می‌توانند به دور از ژن مورد نظر قرار گیرند (Jin *et al*., 2010). استفاده از فناوری‌های جدید و تعیین توالی ژنوم، موجب تشکیل نشانگرهای عملکردی بر پایه‌ی چندشکلی در ژن‌های مرتبط با فنوتیپ و نواحی رمز کننده شده است. نتیجه این موتیف‌های عملکردی بر فنوتیپ است. برای استفاده از نشانگرهای عملکردی ابتدا باید توالی ژن‌های عملکردی چندشکل مشخص شود. نشانگرهای عملکردی در گزینش به کمک نشانگر، تحقیقات فیلوژنتیکی، مکان‌یابی QTLهای مختلف پیوسته با صفات، همسانه‌سازی ژن و تخمین تنوع ژنتیکی کاربرد دارند (Zhang *et al*., 2005). نشانگرهای عملکردی، که به آن‌ها نشانگرهای کامل[۱] نیز گفته می‌شود، جایگزینی برای نشانگرهای تصادفی DNA هستند (Lau *et al*., 2015). مزیت نشانگرهای عملکردی (که قبلاً پیوستگی آن‌ها با صفات مورد نظر مشخص گردیده است) نسبت به سایر نشانگرها، پیوستگی بالای آن‌ها با فنوتیپ است. نشانگرهای عملکردی به دلیل ارتباط کامل با آلل‌های منبع صفت از نشانگرهای DNA تصادفی مانند RFLPها، SSRها و AFLPها برتر هستند. بنابراین برای بررسی یک صفت نیاز به

1- Perfect markers

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-05-31]

[DOI: 10.61186/jcb.15.47.186]

آزمون تعداد زیادی نشانگر نمی‌باشد و با تعداد معدودی از نشانگرهای عملکردی می‌توان نسبت به ردیابی حضور ژن و یا آلل مربوط اقدام نمود. در سنجش فنوتیپی تفاوت هموزیگوت از هتروزیگوت مشخص نیست، اما با استفاده از نشانگرهای عملکردی انتخاب ژنوتیپ مورد نظر در مرحله آغاز نمو میسر است (Gupta *et al*., 2010; Lau *et al*., 2015). عطر یکی از مهم‌ترین عوامل تعیین‌کننده کیفیت برنج، بازارپسندی و قیمت فروش آن است (Juliano & Duff, 1991). از نظر ژنتیکی، عطر برنج حاصل بیان جهش‌های مغلوب ژن OsBadh2 (همچنین به‌عنوان ژن badh/ fgr/ osbadh2/ 2 -استیل-۱-پیرولین نیز شناخته می‌شود) است. ژن Badh2 که بتائین آلدهید دهیدروژناز را کد می‌کند، سنتز 2-acetyl-1-pyrroline را در برنج غیر معطر مهار می‌کند. در مقابل، آلل مغلوب Badh2 منجر به تجمع 2-استیل-۱-پیرولین و در نتیجه برنج معطر می‌شود (Juliano & Duff, 1991). افزایش مقدار 2-استیل-۱-پیرولین در اثر وجود سه چندشکلی در اگزون ۷ و یک حذف ۸ نوکلوتیدی در ژن $BADH_2$ بر روی کروموزوم شماره ۸ برنج‌های معطر، با ایجاد کدون توقف پیش‌رس و تولید پروتئین ناقص اتفاق می‌افتد. همچنین اگر ژن عملکردی $BADH_2$ پروتئینی با تعداد ۵۰۳ آمینواسید را رمز کرده، و سوبسترای تولید کننده 2-استیل-۱-پیرولین را مصرف نماید، سبب عدم تولید عطر در برنج می‌شود (Bradbury *et al*., 2008; Sakthivel *et al*., 2009). حالت غیرعملکردی $BADH_2$ قادر به متابولیزه کردن ۲-استیل-۱-پیرولین نیست و موجب تجمع این ماده شده و در نهایت باعث ایجاد عطر در برنج می‌شود (Bradbury, Fitzgerald, *et al*., 2005; Bradbury *et al*., 2008). برنج معطر مخلوطی از ۱۱۴ ترکیب مختلف فرار است. یکی از آنها، ۲-استیل-۱-پیرولین (2AP)، یک جزء طعم دهنده قوی است که به برنج باسماتی و جاسمین رایحه متمایز می‌بخشد. 2AP در تمام قسمت‌های ارقام برنج معطر به جز ریشه‌ها یافت می‌شود. میزان 2AP در اندام هوایی گیاهان نسبت به دانه‌های برنج آسیاب شده نسبتاً بیشتر است (Buttery *et al*., 1983; Yoshihashi *et al*., 1999). در ابتدا روش‌های بوییدن و یا جویدن دانه‌ها به‌عنوان روش تشخیص عطر و طعم در برنج استفاده می‌شد (Garland *et al*., 2000). سپس روش‌های شیمیایی مانند استفاده از کروماتوگرافی گازی برای تشخیص مقدار ۲-استیل-۱-پیرولین (Lorieux *et al*., 1996) و تست (KOH) (Sood, 1978) پرهزینه و وقت‌گیر بوده و به نمونه برگی زیادی نیاز داشتند. با پیشرفت فناوری روش‌های سنتی انتخاب بوته‌های معطر جای خود را به استفاده از نشانگرهای مولکولی داده است. از مزیت‌های استفاده از نشانگرهای مولکولی نیاز به مقدار کم نمونه، تجزیه و تحلیل با دقت و صحت زیاد، در زمان و هزینه کمتر و شناسایی بوته‌های معطر در مرحله گیاهچه‌ای است (Cordeiro *et al*., 2002). لانگ و بو (Lang & Buu, 2008) گزارش کردند که نشانگرهای DNA مبتنی بر PCR برای گزینش ژنوتیپ‌ها و انتقال دقیق ژن *fgr* به لاین‌های اصلاح شده قابل استفاده هستند. آنها یک نشانگر RFLP، RG۲۸ و نشانگر ریزماهواره RM۲۲۳ که پیوستگی با ژن *fgr* در برنج دارند را شناسایی کردند که می‌تواند بطور مؤثری برای اجرای گزینش به کمک نشانگر در برنامه‌های اصلاحی برنج استفاده شوند. شی و همکاران (Shi *et al*., 2008) انواع جهش‌های آللی مانند حذف ۳ جفت باز را در ناحیه UTR '۵ کشف کردند. آنها نشانگرهای عملکردی در مکانی در بالادست (badh2) با توجه به حذف ۸ جفت باز در پروموتر طراحی کردند. سان و همکاران (Sun *et al*., 2021) در تحقیقی مناطق کدگذاری Os$BADH_2$ در ۱۰ نوع برنج عطری را توالی‌یابی کردند تا نوع جهش یافته آن مشخص شود. یک نشانگر عملکردی E_7 با توجه به حذف ۸ جفت باز در اگزون هفت ژن $OsBADH_2$ در برنج عطری طراحی شد. ژنوتیپ‌های ۱۰ رقم برنج عطری و ۲ جمعیت مشتق شده از ارقام برنج عطری/ ارقام غیر عطری توسط این نشانگر شناسایی و تأیید شد. ژنوتیپ‌های هموزیگوت غالب و هموزیگوت مغلوب و هتروزیگوت $OsBADH_2$ را می‌توان به سرعت و با دقت توسط نشانگر عملکردی E_7 تشخیص داد. نوروز دخت نوخندان و همکاران (Nokhandan *et al*., 2017) تحقیقی برای شناسایی آلل‌های مؤثر در سختی دانه ارقام مختلف نان با کمک نشانگرهای مولکولی انجام دادند. در مکان ژنی Pina-Dl آلل‌های Pina-Dla و Pina-Dlb به ترتیب در ۶۴ درصد و ۳۶ درصد از ارقام مشاهده شد.

با توجه به عدم وجود داده‌های مرتبط با غربالگری ژنوتیپهای مورد مطالعه در این پروژه بر اساس معطر یا غیر معطر بودن، در این تحقیق به غربالگری فنوتیپی و مولکولی ژنوتیپ‌های مختلف برنج بر اساس نشانگرهای مرتبط با صفت عطر پرداخته شده است.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی که شامل ۵۰ ژنوتیپ محلی و اصلاح شده برنج بود که از کلکسیون مؤسسه تحقیقات برنج کشور تهیه شده و کشت گردیدند (جدول۱). در مرحله رویشی برگ‌های جوان تمامی ژنوتیپ‌ها از گیاهچه‌های دو هفته‌ای برش داده شده و تا زمان انجام آزمایشات ژنتیکی در دمای ۸۰- درجه سلسیوس نگهداری شدند. جهت انجام آزمون‌های مولکولی، استخراج DNAاز نمونه‌های برگی جوان به روشCTAB[1] انجام شد (Doyle, 1990). سپس برای تعیین کیفیت DNA استخراج شده، از نحوه تشکیل نوارها بر روی ژل آگارز در الکتروفورز به‌عنوان معیاری برای تعیین کیفیت DNA استفاده گردید. روش اسپکتروفتومتر نیز به‌عنوان روشی مکمل برای تعیین کمیت (غلظت) DNA، مورد استفاده قرار گرفت. سنجش عطر ژنوتیپ‌ها در مرحله پنجه‌دهی با استفاده از نمونه برگ ژنوتیپ‌ها مطابق روش سود (Sood, 1978) انجام شد. بدین صورت که ابتدا ۰/۲ گرم از برگ خرد شده هر ژنوتیپ داخل لوله آزمایش محتوی هیدروکسید پتاسیم ۱/۷ درصد قرار گرفته و ارزیابی عطر دانه در انجام تجزیه برنج با بهره‌گیری از روش هیدروکسید پتاسیم و امتیازدهی مطابق روش ارزیابی استاندارد صفات برنج[2] (IRRI, 2002) انجام شد. برای این منظور ۴۰ تا ۵۰ عدد از دانه‌های برنج سفید از هر ژنوتیپ را به همراه ۱۰ میلی لیتر از محلول KOH ۱/۷ درصد در پتری‌دیش قرار داده

1- Cetyltrimethyl ammonium bromide

2- Standard Evaluation System for rice (SES)

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-05-31]

[DOI: 10.61186/jcb.15.47.186]

و درب پتری‌دیش‌ها را بسته و حدود یک ساعت در دمای محیط قرار داده شد، سپس درب پتری‌دیش‌ها را برداشته و توسط تیم شش نفره از کارشناسان با بازکردن تصادفی درب ظروف پتری دیش و لوله‌های آزمایش و استشمام عطر آن‌ها و بر اساس شدت و ضعف عطر امتیازدهی شد. ژنوتیپ‌های معطر نمره یک و غیر معطر نمره صفر را دریافت و میانگین نمره بین صفر تا یک امتیازدهی شد. برای غربالگری نمونه‌ها با استفاده از نشانگرهای عملکردی، از سه جفت آغازگر وابسته به عطر badh2 (Shi *et al*., 2008)، Nksbad2 (Amarawathi *et al*., 2008) و BADEX7-5 (Sakthivel *et al*., 2009) استفاده شد (جدول ۲).

جدول ۱- مشخصات ژنوتیپ‌های بومی و اصلاح شده برنج مورد ارزیابی در این مطالعه
Table 1. Characteristics of local and improved rice genotypes evaluated in this research

Genotype	ژنوتیپ	Type	تیپ
AbjiBooji	آبجی بوجی	local	بومی
Ahlami Tarom	اهلمی طارم	local	بومی
Ali Kazemi	علی کاظمی	local	بومی
Anam	آنام	improved	اصلاح شده
Anbarboo Ilam	عنبربو ایلام	local	بومی
B115	B115	improved	اصلاح شده
Bejar	بجار	improved	اصلاح شده
Binam	بینام	local	بومی
DCL	DCL	improved	اصلاح شده
Deylamani	دیلمانی	local	بومی
Dom Sefid	دم سفید	local	بومی
Dom Siah	دم سیاه	local	بومی
Dom Zard	دم زرد	local	بومی
Dorfak	درفک	improved	اصلاح شده
Fajr	فجر	improved	اصلاح شده
Fuji minouri	فوجی مینوری	improved	اصلاح شده
Gharib	غریب	local	بومی
Gharib Siah Reyhani	غریب سیاه ریحانی	local	بومی
Ghodsi	قدسی	improved	اصلاح شده
Gohar	گوهر	improved	اصلاح شده
Gohar Mutant	گوهر جهش یافته	improved	اصلاح شده
Hashemi	هاشمی	local	بومی
Hassan Saraee	حسن‌سرائی	local	بومی
Hassani	حسنی	local	بومی
IR36	IR36	improved	اصلاح شده
IR64	IR64	improved	اصلاح شده
Kadoos	کادوس	improved	اصلاح شده
Keshvari	کشوری	improved	اصلاح شده
Koohsar	کوهسار	improved	اصلاح شده
Line 7	لاین ۷	improved	اصلاح شده
Line23	لاین ۲۳	improved	اصلاح شده
Modarresi 1	مدرسی ۱	improved	اصلاح شده
Modarresi 2	مدرسی۲	improved	اصلاح شده
Modarresi 3	مدرسی ۳	improved	اصلاح شده
Modarresi 4	مدرسی ۴	improved	اصلاح شده
Modarresi 5	مدرسی ۵	improved	اصلاح شده
Modarresi 6	مدرسی ۶	improved	اصلاح شده
Mohammadi Chaparsar	محمدی چپرسر	local	بومی
Nemat	نعمت	improved	بومی
Rash	رش	improved	اصلاح شده
RoshanM	روشن M	improved	اصلاح شده
Saleh	صالح	improved	اصلاح شده
Sepidrood	سپیدرود	improved	اصلاح شده
Shahpasand	شاه پسند	local	بومی
T196	T196	local	بومی
Tarom Mahalli	طارم محلی	local	بومی
Tetep	تتپ	improved	اصلاح شده
TH1	TH1	improved	اصلاح شده
Tisa	تیسا	improved	اصلاح شده
Zenit	زنیت	improved	اصلاح شده

پس از تعیین غلظت، نمونه‌های DNA برای انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز رقیق و با استفاده از آغازگرهای نشانگرهای عملکردی (ژن‌های کنترل‌کننده عطر) شامل ۴۰ نانوگرم DNA الگو ۱۰میلی مولار dNTPs، دو میلی مولار $MgCl_2$، ۰/۲

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-05-31]
[DOI: 10.61186/jcb.15.47.186]

میکرو مولار از هر یک از آغازگرها، بافر ۱X PCR و یک واحد آنزیم Taq پلیمراز در حجم۲۰ میکرولیتر انجام شد. چرخه حرارتی به صورت چهار دقیقه و سایر مواد در دستگاه ترموسایکلر با برنامه زمانی خاص واسرشته سازی اولیه به مدت ۵ دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتیگراد، واسرشته سازی به مدت ۱ دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتیگراد سپس ۳۵ چرخه بصورت ۱ دقیقه واسرشته سازی در دمای ۹۴ درجه سانتیگراد ۴۰، ثانیه مرحله اتصال آغازگر بسته به دمای اتصال هر آغازگر، یک دقیقه مرحله بسط در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد و ۱۰ دقیقه بسط نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد بود. پس از انجام واکنشPCR، آشکارسازی باندها و مشاهده باندهای حاصل از الکتروفرز، از ژل آگارز ۴ درصد و رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید، و آشکارسازی باندهای حاصله زیر نور ماوراءبنفش با استفاده ازدستگاه ژل داک صورت پذیرفت. برای اطمینان از صحت نتایج، آزمایشات دو بار تکرار و حضور یا عدم حضور باندهای مرتبط با ژن‌ها به ترتیب با یک و صفر امتیازدهی گردید. محاسبات آماری این مطالعه با استفاده از نسخه ۲۶ نرم‌افزار IBM SPSS statistics و نسخه ۲۰۱۹ نرم‌افزار Microsoft Excel انجام شده و برای تحلیل همبستگی قابل مشاهده بین ژن‌ها و فنوتیپ‌ها، از مدل خطی تعمیم‌یافته رگرسیون لجستیک استفاده شد. در جدول ارزیابی فنوتیپی برگ و دانه، معطر + و غیر معطر – ، نشانگرها، معطر ۱ غیر معطر ۰ و در محاسبات آماری، معطر ۱ و غیر معطر ۰ لحاظ شده است.

جدول۲- توالی و مشخصات آغازگرهای مورد استفاده در آزمایش

Table 2. The sequence and characteristics of applied oligos in this research

ژن Gene	کد دسترسی بانک ژن Genebank accession number	نشانگر marker	توالی Sequence	دمای اتصال Annealing Temp.	اندازه باندی مورد انتظار Expected fragment size	منبع Reference
badh2	MZ748978.1	badex7-5	5'-TTAGGTTCTGAAGCCGGTGC-3' 5'-TCCCAGTAAATGCAACCTAACAGA-3'	55	95/103	Sakthivel *et al*., 2009
badh2	MZ748978.1	Badh2	5'–AGTTATGGTCTGGCTGGTGC–3' 5'-TTGTGTGCTACCCACCCTTC-3'	55	449/456	Shi *et al*., 2008
badh2	MZ748978.1	Nksbad2	5'-ATGGCAACATGGAAGGTAGC-3' 5'-CATCAGCAAGCTCCAAACAA-3'	52	231/238	Amarawathi *et al*., 2008

نتایج و بحث

غربالگری فنوتیپی نمونه‌های مورد مطالعه برای صفت عطر با روش هیدروکسید پتاسیم یک و هفت دهم درصد نشان داد که از ۵۰ ژنوتیپ، ۳۱ رقم معطر و ۱۹ رقم غیر عطری هستند. در تحقیق آرخی (Arkhi, 2010) رقم بجار آروماتیک شناخته شد که با نتایج این تحقیق اختلاف داشت. همچنین در تحقیق سرحدی و همکاران (Sarhadi *et al*., 2008) در تعدادی از ارقام مشابه تست شده در عطری و غیر عطری بودن مطابقت داشتند. در مطالعه کرمی و همکاران (Karami, 2010) ارقام شاهپسند، دم سفید، دم زرد و غیره غیر عطری شناخته شدند که دلیل آن می‌تواند تأثیر مغایرت در ارقام محلی، شرایط آزمایش و اختلاف در منبع تهیه بذر، همچنین دلایل دیگر نظیر عوامل ژنتیکی، زراعی، محیطی (مانند تنش، خاک، درجه حرارت، تغذیه گیاه و به کار بردن کود، عملیات زراعی، تخلیص رقم، انبارکردن و فراوری دانه) در بروز شاخص‌های عطر و کیفیت در برنج‌های معطر باشد. چن و همکاران (Chen *et al*., 2006) در آزمایشات از ترکیب هر دو روش هیدروکسید پتاسیم و کروتوماگرافی گازی استفاده کردند و نتیجه گرفتند روش کروماتوگرافی گازی چون زمانبر و با هزینه زیاد است اگر تعداد نمونه‌ها کم باشد روش خوبی است اما برای تعداد نمونه‌های زیاد روش هیدروکسید پتاسیم روش بهتری است. سیدیک و همکاران (Siddiq *et al*., 2012) بعد از غربالگری فنوتیپی نتیجه گرفتند روش‌های سنتی برای تشخیص کمی یا کیفی 2AP زمانی که ۲AP در غلظت کم باشد یا تعداد زیادی نمونه به طور همزمان آزمایش شوند، اعتبار و کارایی کمتری دارند (Sarhadi *et al*., 2008). پس می‌توان نتیجه گرفت روش تشخیص بویایی عطر با تأثیر هیدروکسید پتاسیم دقت قابل قبولی دارد و برای تشخیص تقریبی عطر مناسب و بسیار کم هزینه است، اما از معایب آن اشباع شدن حس بویایی و درک متفاوت افراد از عطر است. بنابراین باید از سایر روش‌ها مانند کروماتوگرافی گازی استفاده کرد.

نتایج ارزیابی مولکولی و تعیین ژنوتیپ ارقام مختلف برنج از نظر عطر نشان داد ۳۱ ژنوتیپ معطر و ۱۹ ژنوتیپ غیر معطر است که با نتایج آزمون فنوتیپی هیدروکسید پتاسیم ۱/۷ درصد مطابقت داشت. نتایج آزمایش مولکولی (شکل ۱) نشان می‌دهد که از بین سه جفت آغازگر وابسته به عطر Badh2، Nksbad2 و Badex7-5، نشانگر badex 7-5 در ارقام بجار، فجر، آنام و دم زرد الگوی باندی غیر اختصاصی ایجاد کرده و نتوانست تفکیک درستی انجام دهد. اما نشانگرهای Nksbad2 و Badh2 بخوبی توانستند تمام ارقام عطری و غیر عطری را از هم تفکیک کنند. در مطالعه‌ای سیدیک و همکاران (Siddiq *et al*., 2012) چندین نشانگر ریزماهواره را شناسایی کردند که به طور قابل توجهی ارتباط مثبتی با عطر موجود در برنج داشت. آکورو و همکاران (Akwero *et al*., 2020) با هدف ارزیابی حالت عطری نمونه‌های برنج و ارزیابی آلل‌های مختلف ژن *BADH2* با استفاده از نشانگرهای عملکردی طی مطالعه‌ای درمجموع عطر ۵۶ نمونه برنج در انستیتوی تحقیقات منابع زراعی ملی اوگاندا را با استفاده از روش‌های ارزیابی فنوتیپی و نشانگر مولکولی مورد ارزیابی قرار دادند تا تفاوت ژنوتیپ‌های عطری و غیر عطری مشخص گردد. در آن تحقیق و با استفاده از روش ارزیابی فنوتیپی، ۲۳ نمونه عطری و ۳۳ نمونه غیر عطری شناسایی شد. همچنین در نتایج مولکولی آن‌ها، ۲۰ نمونه عطری و ۳۶ نمونه غیر عطری شناسایی گردید. آنالیز نشانگر عملکردی وجود آلل ($BADH_2$-E7) در ۲۰ نمونه‌ی

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-05-31]
[DOI: 10.61186/jcb.15.47.186]

عطری از این مجموعه را تائید نمودند که می‌تواند در برنامه تولید برنج عطری استفاده شود.

جدول۳- مقایسه‌ی نتایج ارزیابی فنوتیپی و نشانگرهای مولکولی برای صفت عطر در ژنوتیپ‌های برنج
Table 3. Comparison phenotyping and molecular markers results for fragrance trait in rice genotypes

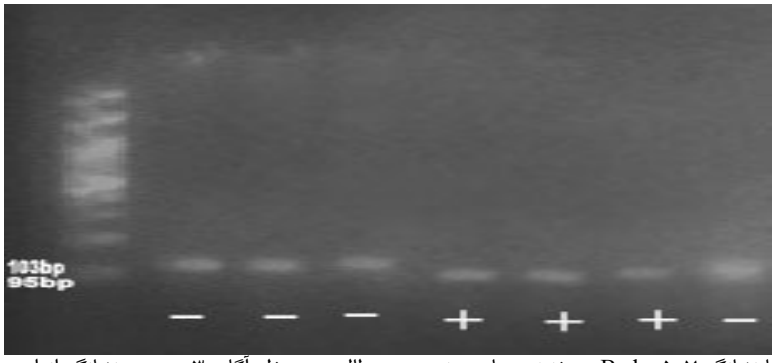
Badex7-5	Badh2	Nksbad2	عطر برگ aroma leaf	عطر دانه aroma grain	Genotype	ژنوتیپ
1	1	1	+	+	AbjiBooji	آبجی بوجی
1	1	1	+	+	Ahlami Tarom	اهلمی طارم
1	1	1	+	+	Ali Kazemi	علی کاظمی
0	1	1	+	+	Anam	آنام
1	1	1	+	+	Anbarboo Ilam	عنبربو ایلام
1	1	1	+	+	B115	B115
1	0	0	-	-	Bejar	بجار
1	1	1	+	+	Binam	بینام
0	0	0	-	-	DCL	DCL
1	1	1	+	+	Deylamani	دیلمانی
1	1	1	+	+	Dom Sefid	دم سفید
1	1	1	+	+	Dom Siah	دم سیاه
0	1	1	+	+	Dom Zard	دم زرد
0	0	0	-	-	Dorfak	درفک
0	1	1	+	+	Fajr	فجر
0	0	0	-	-	Fuji minouri	فوجی مینوری
1	1	1	+	+	Gharib	غریب
1	1	1	+	+	Gharib Siah Reyhani	غریب سیاه ریحانی
1	1	1	+	+	Ghodsi	قدسی
1	1	1	+	+	Gohar	گوهر
1	1	1	+	+	Gohar Mutant	گوهر جهش یافته
1	1	1	+	+	Hashemi	هاشمی
1	1	1	+	+	Hassan Saraee	حسن‌سرائی
1	1	1	+	+	Hassani	حسنی
0	0	0	-	-	IR36	IR36
0	0	0	-	-	IR64	IR64
0	0	0	-	-	Kadoos	کادوس
0	0	0	-	-	Keshvari	کشوری
0	0	0	-	-	Koohsar	کوهسار
0	0	0	-	-	Line 7	لاین ۷
0	0	0	-	-	Line23	لاین ۲۳
0	0	0	-	-	Modarresi 1	مدرسی ۱
1	1	1	+	+	Modarresi 2	مدرسی۲
1	1	1	+	+	Modarresi 3	مدرسی ۳
1	1	1	+	+	Modarresi 4	مدرسی ۴
0	0	0	-	-	Modarresi 5	مدرسی ۵
1	1	1	+	+	Modarresi 6	مدرسی ۶
1	1	1	+	+	Mohammadi Chaparsar	محمدی چپرسر
0	0	1	-	-	Nemat	نعمت
1	1	1	+	+	Rash	رش
0	0	0	-	-	RoshanM	روشن M
0	0	0	-	-	Saleh	صالح
0	0	0	-	-	Sepidrood	سپیدرود
1	1	1	+	+	Shahpasand	شاه پسند
1	1	1	+	+	T196	T196
1	1	1	+	+	Tarom Mahalli	طارم محلی
0	0	0	-	-	Tetep	تتپ
1	1	1	+	+	TH1	TH1
1	1	1	+	+	Tisa	تیسا
0	0	0	-	-	Zenit	زنیت

1: Fragrant, 0:Not-Fragrant, +:Fragrant, -: Non-fragrant

1: معطر، 0: غیرمعطر، +:معطر، –:غیرمعطر

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-05-31]

[DOI: 10.61186/jcb.15.47.186]



شکل۱- نمونه بانددهی با نشانگر Badex۵-۷. در ژنوتیپ‌های برنج مورد مطالعه روی ژل آگارز ۳ درصد و نشانگر اندازه ۱۰۰bp. علامت مثبت برای ژنوتیپ‌های معطر هاشمی، علی کاظمی و دم‌سیاه (۹۵ جفت باز) و علامت منفی برای ژنوتیپ‌های غیرعطری سپیدرود، نعمت، فوجی مینوری و زنیت (۱۰۳ جفت باز) می‌باشند.

Figure 1. Example of marker banding with 5-7Badex marker.for aroma in the studied rice genotypes on 4% agarose gel and 100 bp ladder. The positive shows fragrance genotypes of Hashemi, Ali Kazemi and Domsiah (95 bp) and the negative (-)shows non fragrance genotypes Sepidroud, Nemat, Fuji Minori and Zenit (103 bp)

جدول ۴- درصد صحت طبقه‌بندی الگوی رگرسیون لجستیک، متغیرهای معادله، متغیرهای بیرون از معادله، خلاصه مدل

Table 4. Percentage accuracy of logistic regression model classification, equation variables, variables outside the equation, model summary

درصد صحت پیش بینی Prediction accuracy percentage	ژنوتیپ Genotype غیر معطر Non-Fragrant	 معطر Fragrant			
0. 100.0	19 0	0 31		غیر معطر Non-Fragrant معطر Fragrant	ژنوتیپ Genotype
62.0	درصد کل Overall Percentage				
	ضریب بتا Beta coefficient	خطای استاندارد standard error (S.E.)	والد Wald	درجه آزادی df	معنی‌داری Sig.	Exp (B)
ضریب ثابت Constant	.490	.291	2.823	1	.093	1.632
متغیرهای مستقل Independent variables		نمره Score		درجه آزادی df		معنی‌داری Sig.
Nksbad2		50.000		1		.000
Badh2		50.000		1		.000
Badex7-5		34.987		1		.000
مرحله Step		منهای دو لگاریتم لاکلیهود -2 Log likelihood		ضریب R کاکس و اسنل Cox & Snell R Square		ضریب R نگلکرک Nagelkerke R Square
1		.000[a]		.735		1. 000

در این تحقیق، قطعه‌ی تولید شده در نشانگر Badex7-5 با اندازه حدود ۹۵ جفت باز برای ژنوتیپ‌های معطر و ۱۰۳ جفت باز برای ژنوتیپ‌های غیر معطر بود. بر این اساس از ۵۰ ژنوتیپ مورد مطالعه، ۲۸ ژنوتیپ عطری و ۱۸ ژنوتیپ غیر عطری درست شناسایی شدند. اما این نشانگر در ارقام بجار، فجر، آنام و دم زرد نتوانست تفکیک درستی انجام دهد. بر این اساس می‌توان اظهار داشت که برای توصیه یک نشانگر اختصاصی در برنامه اصلاحی برای گزینش غیرمستقیم، ارزیابی کارایی نشانگر ضروری است. با استفاده از نشانگر Badh2 و تکثیر قطعه‌ی ۴۴۹ جفت بازی در ارقام معطر، ۳۱ رقم به‌عنوان ژنوتیپ‌های معطر شناسایی شدند و نیز با تکثیر قطعه ۴۵۶ بازی در ژنوتیپ‌های غیر معطر، ۱۹ ژنوتیپ دیگر به‌عنوان ژنوتیپ‌های غیرعطری تشخیص داده شدند. آزمایش بویایی با استفاده از هیدروکسید پتاسیم نیز نتایج حاصل از تجزیه فوق را تأیید کرد (جدول۳). برادبری و همکاران (Bradbury, Henry, *et al*., 2005) با استفاده از آغازگرهای ترکیبی، ۱۶۸ بوته F_2 در حال تفرق برای عطر را مورد ارزیابی قرار دادند که فنوتیپ آن‌ها با دقت صد در صد تعیین شد. کتالانی و همکاران (Catalani, 2012) در تحقیقی برای ترمیم صفات کمی و کیفی رقم جدید برنج به نام قائم، از دو رقم محلی شصتک و دمسیاه و دو رقم اصلاح شده فجر و نعمت استفاده نموده و بعد از انجام کلیه تلاقی‌های ممکن بین رقم قائم به عنوان پایه مادری و بقیه ارقام بعنوان پایه پدری و سپس تلاقی‌های مرکب بین F۱ها، با استفاده از نشانگرهای مولکولی پیوسته با ژن‌های هدف اقدام به مطالعه تفکیک و ترکیب ژن‌های موثر مورد نظر کردند و مشخص گردید تلاقی‌های مرکب از قابلیت ترکیب پذیری خوبی (به دلیل دارا بودن هر چهار ژن مورد نظر در گیاه) در مقایسه با سایر تلاقی‌های مرکب برخوردار بوده و دو بوته از مجموع بوته‌های انتخابی، توأمان دارای ژن‌های هموزایگوس عطر و طعم و شکل دانه بوده همچنین سایر بوته‌ها نیز اکثر ژن‌های مورد مطالعه را بصورت هتروزایگوس دارا بودند.

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-05-31]

[DOI: 10.61186/jcb.15.47.186]

در این پژوهش نشانگر Nksbad2 با تکثیر باند با اندازه‌ای حدود ۲۳۸ و ۲۳۱ جفت باز توانست ارقام معطر و غیر معطر را به خوبی از هم متمایز نماید. نتایج نشانگرهای Nksbad2، Badh2 با نتایج حاصل از ارزیابی کیفی عطر با روش هیدروکسید پتاسیم منطبق بود. در نتیجه می‌توان از آن‌ها به‌عنوان یک معیار گزینش ارزان و سریع در شناسایی ژنوتیپ‌های معطر و غیر معطر استفاده کرد. جهت آنالیز آماری با توجه به دو وضعیتی بودن متغیر عطر برای تحلیل داده ها از رگرسیون لجستیک استفاده شد. برازندگی مدل لجستیک در جدول خلاصه مدل و اعداد ۰/۷۳۵ و ۱/۰۰۰ نشان از مناسب بودن مدل رگرسیونی هستند. طبق نتایج و با توجه به p مقدار که برای تمام متغیرهای مستقل از ۵ درصد کوچکتر است وجود تمامی آنها در مدل رگرسیونی معنادار است. در نتیجه با توجه به صفر بودن ($.000^{a}$) نسبت درست نمایی لگاریتمی برازش الگوی رگرسیون لجستیک مناسب است.

منابع

Akwero, A., Ocan, D., Akech, W., Lamo, J., Ochwo-Ssemakula, M., & Rubaihayo, P. (2020). Allelic variations in aroma gene in cultivated rice varieties. *African Crop Science Journal*, *28*(2), 241-254.

Allah gholipour, M., Rabiei, B., Ebadi, A. A., Hosseini, M., & Vikta, M. (2010). Starch adhesion properties: new indicators to evaluate the cooking quality of rice cultivars (*Oryza sativa* L.). *Iranian Journal of Agricultural Sciences*, *12*(2), 140-151. (In Persian).

Amarawathi, Y., Singh, R., Singh, A. K., Singh, V. P., Mohapatra, T., Sharma, T. R., & Singh, N. K. (2008). Mapping of quantitative trait loci for basmati quality traits in rice (Oryza sativa L.). *Molecular Breeding*, *21*, 49-65.

Arkhi, A. (2010). *Identification of rice cultivars in the aroma gene locus using molecular markers* Payam Noor University].

Bradbury, L. M., Fitzgerald, T. L., Henry, R. J., Jin, Q., & Waters, D. L. (2005). The gene for fragrance in rice. *Plant biotechnology journal*, *3*(3), 363-370.

Bradbury, L. M., Gillies, S. A., Brushett, D. J., Waters, D. L., & Henry, R. J. (2008). Inactivation of an aminoaldehyde dehydrogenase is responsible for fragrance in rice. *Plant molecular biology*, *68*, 439-449.

Bradbury, L. M., Henry, R. J., Jin, Q., Reinke, R. F., & Waters, D. L. (2005). A perfect marker for fragrance genotyping in rice. *Molecular Breeding*, *16*, 279-283.

Buttery, R. G., Ling, L. C., Juliano, B. O., & Turnbaugh, J. G. (1983). Cooked rice aroma and 2-acetyl-1-pyrroline. *Journal of agricultural and food chemistry*, *31*(4), 823-826.

Catalani, C. (2012). Investigating the aggregation of important genes controlling quantitative and qualitative traits in rice using molecular markers (MAS). *Agricultural Plant Breeding Journal*, *4*(9), 41-52.

Chen, S., Wu, J., Yang, Y., Shi, W., & Xu, M. (2006). The fgr gene responsible for rice fragrance was restricted within 69 kb. *Plant Science*, *171*(4), 505-514.

Cordeiro, G. M., Christopher, M. J., Henry, R. J., & Reinke, R. F. (2002). Identification of microsatellite markers for fragrance in rice by analysis of the rice genome sequence. *Molecular Breeding*, *9*, 245-250.

Doyle, J. J. (1990). Isolation of plant DNA from faesh tissue. *Focus*, *12*, 13-15.

Garland, S., Lewin, L., Blakeney, A., Reinke, R., & Henry, R. (2000). PCR-based molecular markers for the fragrance gene in rice (Oryza sativa. L.). *Theoretical and Applied Genetics*, *101*, 364-371.

Gupta, P., Kumar, J., Mir, R., & Kumar, A. (2010). 4 Marker-assisted selection as a component of conventional plant breeding. *Plant breeding reviews*, *33*, 145.

Hussain, S., Huang, J., Huang, J., Ahmad, S., Nanda, S., Anwar, S., Shakoor, A., Zhu, C., Zhu, L., & Cao, X. (2020). Rice production under climate change: adaptations and mitigating strategies. *Environment, climate, plant and vegetation growth*, 659-686.

IRRI, I. (2002). Standard evaluation system for rice. *International Rice Research Institute, Philippine*, 1-45.

Jin, L., Lu, Y., Shao, Y., Zhang, G., Xiao, P., Shen, S., Corke, H., & Bao, J. (2010). Molecular marker assisted selection for improvement of the eating, cooking and sensory quality of rice (Oryza sativa L.). *Journal of Cereal Science*, *51*(1), 159-164.

Jin, Q., Waters, D., Cordeiro, G. M., Henry, R. J., & Reinke, R. F. (2003). A single nucleotide polymorphism (SNP) marker linked to the fragrance gene in rice (Oryza sativa L.). *Plant Science*, *165*(2), 359-364.

Juliano, B., & Duff, B. (1991). Rice grain quality as an emerging priority in National rice breeding programmes. *rice grain marketing and quality issues. Los Banos, Laguna, IRRI*, 55-64.

Karami, N. A. (2010). *Study of genes related to rice aroma in Iranian cultivars* Gilan University].

Lang, N. T., & Buu, B. C. (2008). Development of PCR-based markers for aroma (fgr) gene in rice (Oryza sativa L.). *Omonrice*, *16*, 16-23.

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-05-31]

[DOI: 10.61186/jcb.15.47.186]

Lau, W. C., Rafii, M. Y., Ismail, M. R., Puteh, A., Latif, M. A., & Ramli, A. (2015). Review of functional markers for improving cooking, eating, and the nutritional qualities of rice. *Frontiers in plant science*, *6*, 832.

Lorieux, M., Petrov, M., Huang, N., Guiderdoni, E., & Ghesquière, A. (1996). Aroma in rice: genetic analysis of a quantitative trait. *Theoretical and Applied Genetics*, *93*, 1145-1151.

Nokhandan, N., Izanlou, B., Qadri, M., & Qadir, M. (2017). Identification of effective alleles in grain hardness of different varieties of bread wheat with the help of molecular markers. *Agricultural Plant Breeding Journal*, *9*(21), 122-129.

Peng, B., Zhang, Q.-X., Tian, X.-Y., Sun, Y.-F., Huang, X.-H., Pang, R.-H., Wang, Q.-X., Zhou, W., Yuan, H.-Y., & Yang, F. (2021). Influencing factors of grain nutritional quality and its genetic improvement strategy in rice. *Journal of Biotechnology Research*, *7*(1), 1-11.

Sakthivel, K., Sundaram, R., Rani, N. S., Balachandran, S., & Neeraja, C. (2009). Genetic and molecular basis of fragrance in rice. *Biotechnology advances*, *27*(4), 468-473.

Sarhadi, W. A., Hien, N. L., Zanjani, M., Yosofzai, W., Yoshihashi, T., & Hirata, Y. (2008). Comparative analyses for aroma and agronomic traits of native rice cultivars from Central Asia. *Journal of Crop Science and Biotechnology*, *11*(1), 17-22.

Shi, W., Yang, Y., Chen, S., & Xu, M. (2008). Discovery of a new fragrance allele and the development of functional markers for the breeding of fragrant rice varieties. *Molecular Breeding*, *22*, 185-192.

Siddiq, E., Vemireddy, L., & Nagaraju, J. (2012). Basmati rices: genetics, breeding and trade. *Agricultural Research*, *1*, 25-36.

Sood, B. (1978). A rapid technique for scent determination in rice. *Indian Journal of Genetic and Plant Breeding*, *38*, 268-271.

Sun, P.-y., Zhang, W.-h., Shu, F., He, Q., Zhang, L., Peng, Z.-r., & Deng, H.-f. (2021). Analysis of Mutation Sites of OsBADH2 Gene in Fragrant Rice and Development of Related Functional Marker. *Biotechnology Bulletin*, *37*(4), 1.

Yoshihashi, T., Huong, N. T. T., & Kabaki, N. (1999). Quality evaluation of Khao Dawk Mali 105, an aromatic rice variety of northeast Thailand. *JIRCAS Working Report*, *30*, 151-160.

Zhang, L.-P., Ge, X.-X., He, Z.-H., Wang, D.-S., Yan, J., Xia, X.-C., & Sutherland, M. W. (2005). Mapping QTLs for polyphenol oxidase activity in a DH population from common wheat. *Zuowu Xuebao*, *31*(1), 7-10.

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-05-31]

[DOI: 10.61186/jcb.15.47.186]