

## بررسی تنوع ژنتیکی ارقام برنج ایرانی با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره پیوسته با ژن‌های مقاومت به خشکی

رضا امینی نسب<sup>۱\*</sup>، محمدعلی ابراهیمی<sup>۲</sup>، علی اکبر عبادی<sup>۳</sup> و محسن قدسی<sup>۴</sup>  
 ۱، دانش آموخته کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشگاه پیام نور، تهران، ۲، استادیار گروه بیوتکنولوژی کشاورزی،  
 دانشگاه پیام نور، تهران، ۳، ۴، عضو هیئت علمی مؤسسه تحقیقات برنج کشور،  
 (تاریخ دریافت: ۹۰/۱۰/۱۰ - تاریخ تصویب: ۹۰/۱۲/۲)

## Study of Genetic Variation in Iranian Rice (*Oryza sativa* L.) Varieties by using Molecular Markers Linked with Drought Resistance Genes

R. AMINI NASAB<sup>1\*</sup>, M. A. EBRAHIMI<sup>2</sup>, A. A. EBADI<sup>3</sup> AND M. GHODSI<sup>4</sup>

1, Graduated of M.Sc., Payame Noor University, Tehran, Iran

2, Department of Agricultural Biotechnology, Payame Noor University, Tehran, Iran

3, 4, Member of Scientific Board of Rice Research Institute of Iran

(Received: Dec. 28, 2011 - Accepted: Feb. 21, 2012)

### Abstract

### چکیده

The study was designed to characterize the genetic diversity within a subset of 20 Iranian rice (*Oryza sativa* L.) varieties using 19 microsatellite markers linked to the genes controlling drought tolerance. Also drought resistance index as an important integrative trait in maturity stage was evaluated in 20 varieties in two environments (stress and non-stress). Results of the combined analysis showed significant differences ( $P < 0.01$ ) between varieties and drought resistance index. According to the results obtained, varieties Sangejoe, Khazar and 831 showed the highest stability for yield and physiological characteristics. A total of 19 simple sequence repeats (SSR) in the 20 genotypes studied revealed polymorphism. The total number of alleles observed were 142 with an average of 7.47 allele per locus. Among the markers, RM166 represented the highest number of alleles (11 alleles) and RM152, and RM555 represented the lowest number of alleles (5 alleles). The average value of PIC was 0.817. Computation of genetic similarity with molecular data by Jacard similarity coefficient and UPGMA algorithm, divided the genotypes into 6 groups. Principal coordinated analysis was conducted in order to determine the relationships among genotypes. The SSR markers used thoroughly showed genetic diversity among the Iranian rice varieties

این تحقیق به منظور بررسی تنوع ژنتیکی مجموعه‌ای از ۲۰ رقم برنج ایرانی، با استفاده از ۱۹ نشانگر ریزماهواره پیوسته با ژن‌های کنترل‌کننده تحمل به خشکی، انجام گرفت. همچنین شاخص مقاومت به خشکی به عنوان یک صفت تکمیلی مهم در مرحله رسیدگی دانه در ۲۰ رقم و دو محیط (تحت تنش و بدون تنش آبی)، مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج تجزیه واریانس مرکب نشان داد که بین ژنوتیپ‌ها از لحاظ صفت عملکرد دانه و اجزای آن و به تبع آن شاخص مقاومت به خشکی، اختلاف معنی‌داری (در سطح احتمال یک درصد) وجود داشته و اثر محیط نیز بر عملکرد دانه در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود. براساس نتایج آزمایش حاضر رقم‌های سنگ‌جو، خزر و لاین ۸۳۱ بیشترین پایداری عملکرد و ویژگی‌های فیزیولوژیکی را در برابر تنش کمبود آب نشان دادند. در همه ۱۹ نشانگر ریزماهواره در ۲۰ ژنوتیپ مورد مطالعه چندشکلی مشاهده گردید. در مجموع ۱۴۲ آلل با میانگین ۷/۴۷ آلل در هر جایگاه ژنی مشاهده شد. نشانگر RM۱۶۶ دارای بیشترین تعداد آلل (۱۱ آلل) و نشانگرهای RM۱۵۲ و RM۵۵۵ دارای کمترین تعداد آلل (۵ آلل) بودند. همچنین میانگین PIC نیز ۰/۸۱۷ برآورد شد که نشانگر RM۱۶۶ با PIC ۰/۸۹ بیشترین و RM۱۵۲ با PIC ۰/۷ کمترین را نشان داد. محاسبه شباهت ژنتیکی بین داده‌های مولکولی توسط ضریب تشابه Jacard و الگوریتم UPGMA، ژنوتیپ‌ها را به ۶ دسته تقسیم کرد. تجزیه به مختصات اصلی به نحوی، تأییدکننده گروه‌بندی تجزیه خوشه‌ای ژنوتیپ‌ها بود. تمامی نشانگرهای ریزماهواره مورد استفاده در این تحقیق تنوع ژنتیکی بین ارقام برنج ایرانی را به خوبی نشان دادند.

**Keywords:** Rice, Genetic diversity, Drought tolerance, Drought resistance index, microsatellite markers.

**واژه‌های کلیدی:** برنج، تنوع ژنتیکی، تنش خشکی، شاخص مقاومت به خشکی، نشانگر ریزماهواره

## مقدمه

برنج (*Oryza sativa* L.) بعد از گندم مهم‌ترین گیاه زراعی دنیا بوده و غذای بیش از دو سوم مردم جهان را تأمین می‌کند. پدیده خشکی عارضه‌ای فوق‌العاده پیچیده است که با توجه به برهم خوردن آب و هوای جهانی و کاهش بارندگی‌های سالیانه بیش از سایر تنش‌های غیرزیستی مانند شوری، غرق‌آب شدن و آفات و بیماری‌ها، باعث کاهش عملکرد جهانی گیاهان زراعی می‌گردد (Berneir et al. 2007; Burke et al. 2006). تنش خشکی مانع از تظاهر کامل پتانسیل ژنتیکی گیاهان زراعی شده و از این رو موجب کاهش تولیدات کشاورزی می‌گردد. برنج گیاهی حساس در برابر خشکی یا کمبود آب محسوب می‌شود (Laffite et al. 2004). تنش کمبود آب یک تنش چندبعدی است که بر سطوح مختلف سازمانی گیاه اثر می‌گذارد از طرفی یکی از اهداف مهم در اصلاح نباتات، بهبود زادآوری، باروری و عملکرد محصول در شرایط خشکی است. هرچند که اصلاح‌گران برنج به انتخاب مستقیم براساس عملکرد دانه در شرایط تنش خشکی تأکید دارند (Jongdee et al. 2006)، اما شواهد نشان داده است که به‌علت وراثت‌پذیری پایین عملکرد، تحت شرایط تنش و اثرات محیطی، روش‌های کلاسیک اصلاح نباتات از سرعت کندی برخوردار است. پیشرفت در اصلاح تحمل به خشکی به‌کندی صورت می‌گیرد که این امر به دلایلی شامل: (۱) دانش محدود در زمینه ژنتیک تحمل به خشکی؛ (۲) پیچیدگی برخی مکانیسم‌های دخیل در تحمل خشکی؛ (۳) روش‌های گزینش نامناسب؛ (۴) کارایی پایین انتخاب؛ (۵) فقر اطلاعات در زمینه خشکی و اثر متقابل محیطی می‌باشد.

یک رویکرد مهم در اصلاح نباتات افزایش تنوع ژنتیکی بین ژنوتیپ‌های والدینی برای تلاقی است.

تنوع ژنتیکی بین ژنوتیپ‌های والدینی معمولاً به‌وسیله تفاوت‌های مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی صفات مهم اقتصادی و کمی ارزیابی می‌شود. معایب این شیوه مرسوم، وقت‌گیر بودن، سخت بودن و تأثیر عوامل محیطی در خلال اندازه‌گیری می‌باشد. اغلب، این زیان‌ها در اصلاح برای خشکی شدیدتر است. مثلاً هر تغییری در محیط، مثل دما، نور یا رطوبت می‌تواند به‌طور قابل ملاحظه‌ای نیروهای ناشی از تبخیر و تعرق را تغییر دهد (Zheng et al. 2006). توجه به این نکته مهم است که صفات مورفولوژیک اغلب دارای تعداد محدودی بوده و ممکن است ارتباط ژنتیکی حقیقی بین ژنوتیپ‌ها را به‌خوبی نشان ندهند. برعکس، تفاوت ژنتیکی بر اساس چندشکلی (پلی‌مورفیسم) DNA زیاد بوده و مستقل از عوامل محیطی می‌باشد. علاوه بر این، وقتی صفات کمی بررسی می‌شود، مقدار زیادی نمونه برای ارزیابی ژنوتیپ‌ها لازم است. در مقابل، وقتی آنالیز چندشکلی DNA صورت می‌گیرد، مقدار نمونه کمی می‌تواند آگاهی‌بخش باشد. بنابراین سنجش‌های نشانگرهای مولکولی، موجب افزایش کارایی در تهیه ژنوتیپ‌های مقاوم به خشکی می‌گردد زیرا بیان آن‌ها مستقل از اثرات محیطی بوده، وقت کمتری گرفته و کم‌زحمت‌تر می‌باشند، از طرفی قابل اعتمادتر و راحت‌تر می‌باشند (Kamoshita et al. 2008; Zheng et al. 2006).

تشخیص نشانگرهای پیوسته با ژن‌های کنترل‌کننده تحمل به خشکی از نیازهای اصلاح واریته‌های برنج با عملکرد بالا در نواحی خشک می‌باشد. از میان نشانگرهای DNA نشانگرهای ریزماهوره<sup>۱</sup> به‌طور مؤثری برای تعیین تنوع ژنتیکی بین ارقام برنج مورد استفاده قرار گرفته‌اند (Kanagaraj et al. 2010; Yang et al. 1999).

تحمل این ژنوتیپ‌ها مورد بررسی قرار گیرد.  
۳. بررسی عملکرد دانه در ارقام مورد مطالعه و انتخاب ارقام مقاوم‌تر، مورد تحقیق قرار گیرد.

## مواد و روش‌ها

### مواد گیاهی

این آزمایش در سال زراعی ۹۰-۸۹ (اردیبهشت - شهریور) در مؤسسه تحقیقات برنج کشور واقع در رشت با طول جغرافیایی ۴۹ درجه و ۳۸ دقیقه شرقی و عرض جغرافیایی ۳۷ درجه و ۱۲ دقیقه شمالی و با ارتفاع حدود ۲۱ متر از سطح دریا انجام شد. مواد گیاهی مورد استفاده در این تحقیق شامل ۲۰ واریته برنج رایج در کشور بود که از مؤسسه تحقیقات برنج کشور تهیه شدند، همچنین برآورد صفت عملکرد دانه در مرحله رسیدگی دانه جهت بررسی شاخص مقاومت به خشکی برای ژنوتیپ‌های مورد مطالعه در نظر گرفته شد. این آزمایش در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار در دو زمین آزمایشی مجزا که یکی در شرایط تنش کمبود آب و دیگری تحت شرایط آبیاری کامل اجرا شد. مساحت هر یک از دو زمین‌های مورد آزمایش ۹۰۰ مترمربع بود. آزمایش شامل سه بلوک بیست کرتی بود که فاصله بین بلوک‌ها و همچنین فاصله بین کرت‌ها در هر بلوک ۵۰ سانتی‌متر در نظر گرفته شد. ابعاد هر کرت ۱۲ مترمربع (۳×۴ متر) انتخاب گردید. آبیاری کرت‌های بدون تنش، تا انتهای مرحله رسیدگی دانه به‌طور کامل انجام شد و آبیاری کرت‌های تحت تنش از زمان نشاکاری تا مرحله آغازش خوشه، به‌طور کامل و مشابه کرت‌های بدون تنش اجرا گردید، از این مرحله تا زمان برداشت، آبیاری به‌طور کامل قطع گردید به عبارت دیگر اعمال تنش خشکی در کرت‌های تحت تنش، از مرحله آغازش خوشه تا پایان مرحله رسیدگی دانه صورت گرفت. همچنین به منظور خروج سریع‌تر و بهتر آب ناشی از بارش‌های احتمالی، زهکش‌هایی با عمق حدود ۵۰ سانتی‌متر در

طبق بررسی Song-ping *et al.* (2007) شاخص مقاومت به خشکی<sup>۱</sup> از نسبت عملکرد دانه در شرایط تنش آبی به عملکرد دانه در شرایط معمول آبی در زمان رسیدن دانه برآورد شده و تنوع معنی‌داری برای این صفت در جمعیت لاین‌های اینبرد نوترکیب<sup>۲</sup> (RILs) حاصل از تلاقی (*Zhenshan97B*×*IRAT109*) مشاهده شد. در آن بررسی همبستگی معنی‌داری بین شاخص مقاومت به خشکی و عملکرد دانه در بوته مشاهده گردید و برای شاخص مقاومت به خشکی، ۴ QTL شناسایی شد که شامل یک QTL روی کروموزوم شماره یک بین نشانگرهای RM104-RM414، یک QTL روی کروموزوم شماره ۴ بین نشانگرهای RM273-RM252 و QTL دیگری روی کروموزوم شماره ۵ بین نشانگرهای RM547-RM169 و QTL بعدی روی کروموزوم شماره ۱۲ ژنوم برنج بین نشانگرهای RM160-RM215 شناسایی گردید (HU Song-ping *et al.* 2007).

$$DRI = \frac{\text{عملکرد دانه در شرایط تنش آبی}}{\text{عملکرد دانه در شرایط معمول آبی}} \quad (1)$$

در این تحقیق با استفاده از نشانگرهای ریزماهوره که در سایت گرامینه<sup>۳</sup> به‌عنوان نشانگرهای پیوسته با ژن‌های تحمل به خشکی در گیاه برنج گزارش شده‌اند و بررسی شاخص‌های مقاومت به خشکی سعی شده است تا:

۱. تنوع ژنتیکی تعدادی از ژنوتیپ‌های برنج در دسترس که عمدتاً ایرانی بودند در سطح مولکولی با استفاده از نشانگرهای مذکور (نشانگرهای پیوسته با ژن‌های تحمل به خشکی) مورد ارزیابی قرار گیرد.
۲. با اندازه‌گیری شاخص مقاومت به خشکی، تنوع و

1. Drought resistance index  
2. Recombinant inbred lines  
3. <http://gramene.org>

PCR به روش Touchdown (Don et al. 1991) و با استفاده از ۱۹ جفت آغازگر ریزماهواره ژنوم گیاه برنج<sup>۳</sup> (RM) که پیوسته با صفات مهم مرتبط با خشکی در گیاه برنج هستند و از میان نشانگرهای SSR که توسط سایر محققان در سایر جوامع مورد استفاده و تایید قرار گرفت، انتخاب و در ژنوتیپ‌های این تحقیق مورد مطالعه و ارزیابی قرار گرفت. جهت تفکیک محصولات واکنش PCR از الکتروفورز ژل پلی‌اکریل‌امید ساده ۱۰٪ و برای آشکارسازی الگوی نواربندی از روش رنگ‌آمیزی اتیدیوم بروماید استفاده گردید. پس از ثبت تصاویر ژل‌ها توسط دستگاه ژل داک، وزن مولکولی باندهای تشکیل‌شده در هر ژل با استفاده از نرم‌افزار Quantity One محاسبه شد.

### تجزیه آماری داده‌های مولکولی

امتیازدهی باندها به صورت صفر و یک (صفر به عنوان عدم وجود و یک نشان‌دهنده وجود باند) به طور مشاهده‌ای و با استفاده از امکانات نرم‌افزار Photoshop صورت گرفت. تجزیه خوشه‌ای داده‌های مولکولی با استفاده از ضریب تشابه جاکارد<sup>۴</sup> و الگوریتم UPGMA و توسط نرم‌افزار NTSYS version 2.1 انجام گرفت. ضریب تشابه جاکارد به دلیل بالاتر بودن ضریب همبستگی کوفتیک<sup>۵</sup> ( $r = 0.92$ ) نسبت به سایر روش‌ها از قبیل ضریب نی و لی<sup>۶</sup> (ضریب Dice) و یا ضریب تطابق ساده<sup>۷</sup> انتخاب گردید.

ظرفیت اطلاعات چندشکل<sup>۸</sup> PIC که نشان‌دهنده نشان‌دهنده ارزش هر نشانگر برای بیان چندشکلی است، توسط رابطه ۳ محاسبه شد. (Mohammadi, 2006)

$$P_{ij} = 1 - \sum_{z=1}^n P_{ij}^2 \quad (3)$$

3. Rice Microsatellite

4. Jacard

5. Cophenetic correlation coefficient

6. Nei & Li

7. Simple Matching

8. Polymorphic Information Content

بین بلوک‌ها و اطراف واحدهای آزمایشی تحت تنش احداث شد. خصوصیات زراعی ژنوتیپ‌های مورد آزمایش عبارتند از: ۳ رقم برنج بومی شامل سنگ‌جو، علی‌کاظمی، هاشمی، ۱۰ رقم اصلاح‌شده شامل خزر، درفک، ساحل، سپیدرود، شفق، شیرودی، فجر، قائم، ندا، نعمت و ۷ لاین امیدبخش شامل ۱۰۸، ۲۰۳، ۲۰۹، ۴۱۵، ۴۱۶، ۸۳۱ و ۸۴۱.

### بررسی شاخص مقاومت به خشکی<sup>۱</sup> (DRI)

تجزیه واریانس مرکب و مقایسه میانگین داده‌های مورفولوژیکی توسط نرم‌افزار SAS انجام شد. طبق رابطه HUSong-ping et al. (2007)، جهت تعیین شاخص مقاومت به خشکی نیاز به محاسبه عملکرد دانه در ارقام مورد بررسی، در هر دو شرایط معمول و تنش آبی می‌باشد. به منظور تعیین عملکرد دانه، با مشاهده علائم رسیدگی فیزیولوژیکی، بوته‌های ۲ مترمربع از هر کرت برداشت و محصول شلتوک هر کرت توزین شد. همچنین رطوبت شلتوک‌های هر کرت در زمان وزن کردن آن، با استفاده از دستگاه رطوبت‌سنج غلات اندازه‌گیری شد. عملکرد دانه بر حسب رطوبت ۱۴ درصد از رابطه ۲ محاسبه گردید:

(۲)

= عملکرد دانه با رطوبت ۱۴ درصد (هکتار در تن)

عملکرد اندازه‌گیری شده ×  $\frac{\text{رطوبت اندازه‌گیری شده} - 100}{86}$

### بررسی‌های مولکولی با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره

فرایند استخراج DNA از نمونه‌های برگ با روش Murray and Thompson (1980) معروف به روش TAB<sup>۲</sup> انجام گرفت. برای تعیین کمیت و کیفیت DNA استخراجی از روش اسپکتروفتومتری و الکتروفورز ژل آگارز ۱ درصد استفاده شد. واکنش

1. Drought resistance index

2. Cetyltrimethyl Ammonium Bromide

## نتایج و بحث

نتایج تجزیه واریانس مرکب نشان داد که اثر محیط بر میزان عملکرد دانه و اجزای آن، در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود. به عبارت دیگر تنش کمبود آب بر صفت عملکرد دانه و اجزای آن در ژنوتیپ‌های مورد مطالعه، اثر معنی‌داری داشت. همچنین مشخص شد که اثر ژنوتیپ بر عملکرد دانه، در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود. به عبارت دیگر بین ژنوتیپ‌های برنج از لحاظ بروز عملکرد دانه تفاوت معنی‌داری وجود داشت.

با توجه به شاخص مقاومت به خشکی و بر اساس نتایج آزمایش حاضر رقم‌های سنگ‌جو، خزر و لاین ۸۳۱ بیشترین پایداری عملکرد و ویژگی‌های فیزیولوژیکی را در شرایط تنش کمبود آب نشان دادند.

۲۰ ژنوتیپ موردنظر براساس منشاء ژنتیکی، در سه جمعیت بومی، اصلاح‌شده و لاین امیدبخش مورد مطالعه قرار گرفتند. ۱۹ جفت نشانگرهای ریزماهواره مورد استفاده در این مطالعه در ۲۰ ژنوتیپ در مجموع ۱۴۲ آلل با میانگین ۷/۴۷ آلل به ازای هر جایگاه نشانگری ایجاد نمودند و همگی نشانگرها باندهای چندشکل (پلی‌مورف) ایجاد کردند. ظرفیت اطلاعات

که در آن:

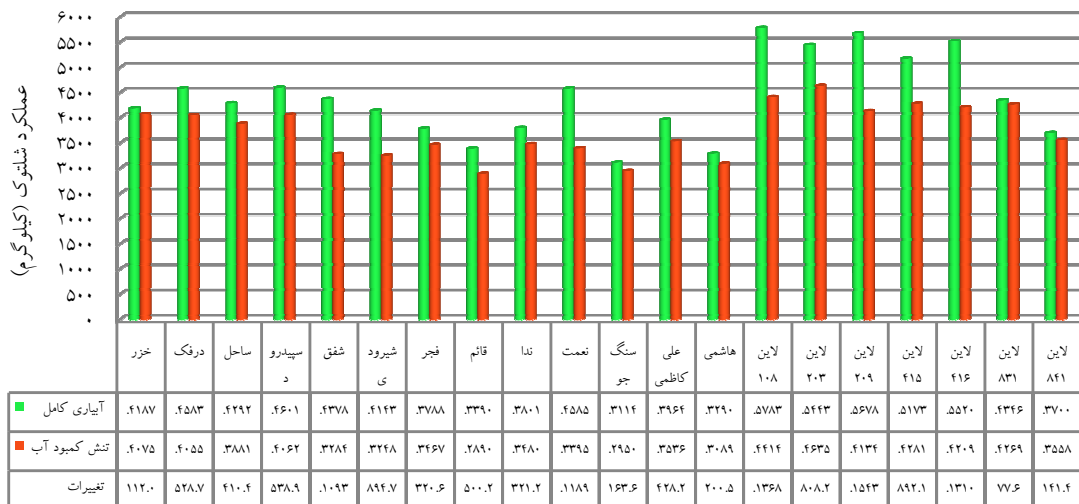
P<sub>ij</sub>: فراوانی ژامین ال از نشانگر i

n: تعداد کل ال‌های مشاهده‌شده برای لوکوس نشانگری

تنوع ژنتیکی درون جمعیتی براساس شاخص نی<sup>۱</sup> و تنوع ژنوتیپی جمعیت‌های مورد مطالعه براساس شاخص اطلاعات شانون<sup>۲</sup> و با استفاده از نرم‌افزار POPGENE ver32 محاسبه گردید. محاسبه فاصله و تشابه ژنتیکی بین جمعیت‌ها، با استفاده از نرم‌افزار POPGENE ver32 و براساس روش نی و با در نظر گرفتن اریبی صورت گرفته و سپس دندروگرام آن بر پایه فاصله ژنتیکی نی و به روش UPGMA<sup>۳</sup> برای جمعیت‌ها رسم شد.

جهت تأیید تجزیه کلاستر داده‌های مولکولی، تجزیه به مختصات اصلی توسط نرم‌افزار NTSYS ver2.1 صورت گرفت. تجزیه واریانس داده‌های مولکولی<sup>۴</sup> (AMOVA) توسط نرم‌افزار Genalex ver6.2 صورت گرفت.

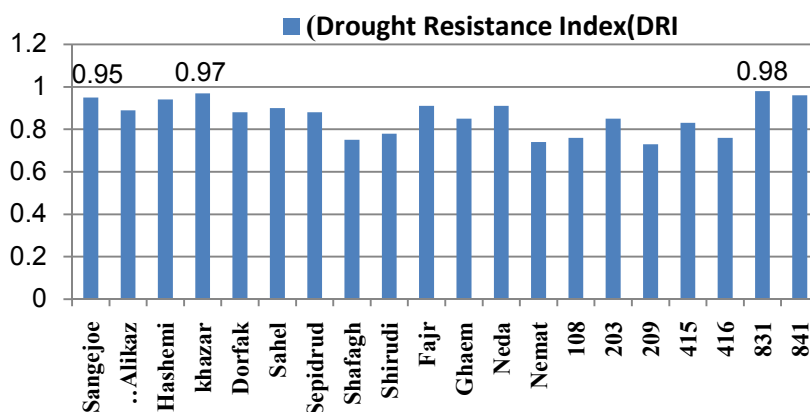
1. Nei Index
2. Shannon's Information Index
3. Unweighted paired Group Method with Arithmetic
4. Analysis of Molecular Variance



شکل ۱- مقایسه میانگین عملکرد شلتوک در دو شرایط آبیاری کامل (رنگ سبز) و کمبود آب (رنگ قرمز)  
جدول ۱- تجزیه واریانس صفت عملکرد دانه و اجزای آن در ژنوتیپ‌های برنج در شرایط آبیاری مطلوب و تحت تنش آبی

میانگین مربعات (MS)				درجه آزادی	منابع تغییر
وزن هزار دانه	تعداد دانه پر در خوشه	تعداد خوشه در بوته	عملکرد شلتوک		
۰/۰۰۰۰۵۳**	۱۴۵۶/۰۳۳**	۲۶/۱۳۳۳**	۱۳۴۹۸۳۶۴/۷۱**	۱	محیط
۰/۰۰۰۰۰۱	۰/۷۹۱۶۶	۰/۲۱۶۶۶	۶۷۰۰۰/۳۱۰۰	۴	تکرار درون محیط
۰/۰۰۰۰۱۶**	۲۰۵/۴۶۴**	۳۶/۲۲۶۳**	۲۴۰۲۱۹۹/۱۲**	۱۹	ژنوتیپ
۰/۰۰۰۰۰۴**	۲۶/۲۰۸۷**	۴/۵۰۱۷**	۳۲۶۵۱۴/۹۴۰**	۱۹	ژنوتیپ × محیط
۰/۰۰۰۰۰۰۰۲	۰/۷۰۳۹۴۷	۰/۲۱۶۶۶۶۷	۳۲۳۴/۱۸	۷۶	اشتباه آزمایشی
۰/۵۷	۱/۵۷	۲/۳۷	۱/۴۰		ضریب تغییرات (درصد)

ns، \* و \*\* غیر معنی‌دار و معنی‌دار در سطوح احتمال ۵٪ و ۱٪.



شکل ۲- نمودار شاخص مقاومت به خشکی در ژنوتیپ‌های برنج مورد بررسی

کمترین تعداد باند (۵ آلل) و PIC ۰/۷ کمترین PIC را نشان داد. نتایج محاسبه تنوع ژنی نی و تنوع ژنوتیپی بین جمعیت‌ها و تشابه و فاصله ژنتیکی بین جمعیت‌ها به شرح جداول زیر صورت گرفت.

چندشکلی (PIC) از ۰/۸۹ تا ۰/۷۰ متغیر بود و میانگین آن ۰/۸۱۷ برآورد گردید، که نشانگر RM166 با تولید بیشترین تعداد باند (۱۱ آلل) و PIC ۰/۸۹ بیشترین و نشانگر RM152 با تولید

جدول ۲- شاخص اطلاعاتی شانون (I)، درصد جایگاه‌های چند شکل (P) و هتروزیگوسیتی مورد انتظار

جمعیت	I	P	Exp_Het
ارقام بومی	0.98 ± 0.21	40%	0.73 ± 0.12
ارقام اصلاح شده	1.51 ± 0.33	71%	0.79 ± 0.11
لاین امیدبخش	1.06 ± 0.35	50%	0.63 ± 0.17
کل	1.81 ± 0.28	—	—

جدول ۳- تشابه و فاصله ژنتیکی بین جمعیت‌ها براساس شاخص Nei و با احتساب اریبی

لاین امید بخش	ارقام اصلاح شده	ارقام بومی	جمعیت
0.1540	0.4487	****	ارقام بومی
0.3936	****	0.8014	ارقام اصلاح شده

لایین امیدبخش	1.8710	0.9324	****
---------------	--------	--------	------

\* اعداد بالای قطر ماتریس بیانگر تشابه ژنتیکی و اعداد پایین قطر ماتریس بیانگر فاصله ژنتیکی بین جمعیت‌ها است.

جدول ۴- تعداد آلل مشاهده شده (Na)، تعداد آلل مؤثر (Ne) و تنوع ژنی Nei

جمعیت	تعداد افراد	Na	Ne	تنوع ژنی Nei
ارقام بومی	3	2.74 ± 0.45	2.68 ± 0.54	0.61 ± 0.1
ارقام اصلاح شده	10	5.16 ± 1.39	4.46 ± 1.35	0.75 ± 0.11
لایین امیدبخش	7	3.47 ± 1.02	2.76 ± 0.95	0.59 ± 0.16
میانگین	—	3.79 ± 0.95	3.3 ± 0.95	0.65 ± 0.12

جدول ۵- صفات مرتبط با خشکی، ظرفیت اطلاعات چندشکلی، تعداد و دامنه باندهای تولیدشده توسط آغازگرها

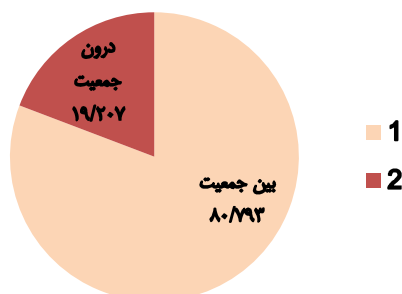
ردیف	آغازگرهای SSR	تعداد باند ایجادشده	دامنه باندهای تکثیر شده (bp)	PIC	صفات مرتبط با خشکی
1	RM3	8	111-124	0.860	میزان سبزیبگی برگ
2	RM72	10	136-155	0.890	تاخیر در گلدهی
3	RM125	8	120-149	0.780	طول برگ پرچم
4	RM152	5	158-169	0.700	عملکرد دانه
5	RM166	11	117-162	0.890	عرض برگ پرچم
6	RM208	6	106-109	0.775	شاخص برداشت
7	RM209	6	123-157	0.720	هدایت روزنه ای برگ
8	RM210	9	137-156	0.825	ارتفاع بوته
9	RM212	10	112-139	0.873	محتوای نسبی آب برگ
10	RM228	10	108-118	0.855	فتوستتوز و انتقال مجدد
11	RM257	7	203-222	0.810	عملکرد دانه
12	RM273	6	188-203	0.855	وزن هزار دانه
13	RM317	8	147-161	0.855	تعداد خوشه در بوته
14	RM454	6	195-212	0.813	پتانسیل اسمزی برگ
15	RM520	7	222-258	0.852	تعداد دانه در خوشه
16	RM525	7	171-199	0.785	شاخص مقاومت به خشکی
17	RM545	6	214-241	0.780	عملکرد ماده خشک
18	RM555	5	218-235	0.765	دمای سایه انداز
19	RM566	7	238-272	0.840	طول خوشه
جمع کل	—	142	—	15.523	—
میانگین	—	7.47	—	0.817	—

ارقام اصلاح شده یا به صورت معرفی مستقیم از ارقام وارداتی یا از طریق تلاقی ارقام وارداتی با ارقام محلی و یا از طریق تلاقی ارقام محلی با سایر ارقام اصلاح شده قبلی به دست آمده‌اند. بنابراین زمینه ژنتیکی متنوعی دارند که باعث شده تا فاکتورهای تنوع ژنتیکی در این جمعیت نسبت به سایر جمعیت‌ها بالاتر باشد.

جدول ۶- تجزیه واریانس داده‌های مولکولی (AMOVA)

بر اساس نتایج به دست آمده، بیشترین میزان تنوع درون جمعیتی، در بین ژنوتیپ‌های ارقام اصلاح شده مشاهده شد. زیرا بیشترین میزان تنوع ژنوتیپی، تعداد آلل مؤثر، تنوع ژنی، درصد جایگاه‌های چندشکل که همگی از شاخص‌های مهم تنوع ژنتیکی درون جمعیت‌ها هستند در این جمعیت برآورد گردید. این امر شاید به این دلیل باشد که تعداد افراد این جمعیت بیشتر از دو جمعیت دیگر بوده و از طرفی والدین این جمعیت از تمایز ژنتیکی بالای برخوردار بودند، زیرا

مورد مطالعه بوده و شکل ۵ پراکنش دوبعدی ژنوتیپ‌ها را نشان می‌دهد.



شکل ۳- نمودار تجزیه واریانس داده‌های مولکولی

باتوجه به نتایج به دست آمده، ۱۹ نشانگر ریزماهوره پیوسته با صفات مرتبط به خشکی، در این مطالعه علاوه بر برخورداری از مزایایی چون فراوانی زیاد و چندشکلی بالا، دارای توزیع یکنواختی روی ژنوم ژنوتیپ‌های برنج مورد مطالعه بوده و برای تفکیک واریته‌های برنج، مناسب می‌باشند. همچنین ارقام سنگ‌جو با کاهش عملکرد ۵/۲٪، خزر با کاهش عملکرد ۲/۶٪ و لاین ۸۳۱ با کاهش عملکرد ۱/۷٪ به‌عنوان ارقام مقاوم به تنش خشکی شناخته شدند. نتایج فوق تا حدودی با سایر نتایج حاصل از دیگر تحقیقات انجام شده در این زمینه همخوانی داشته است.

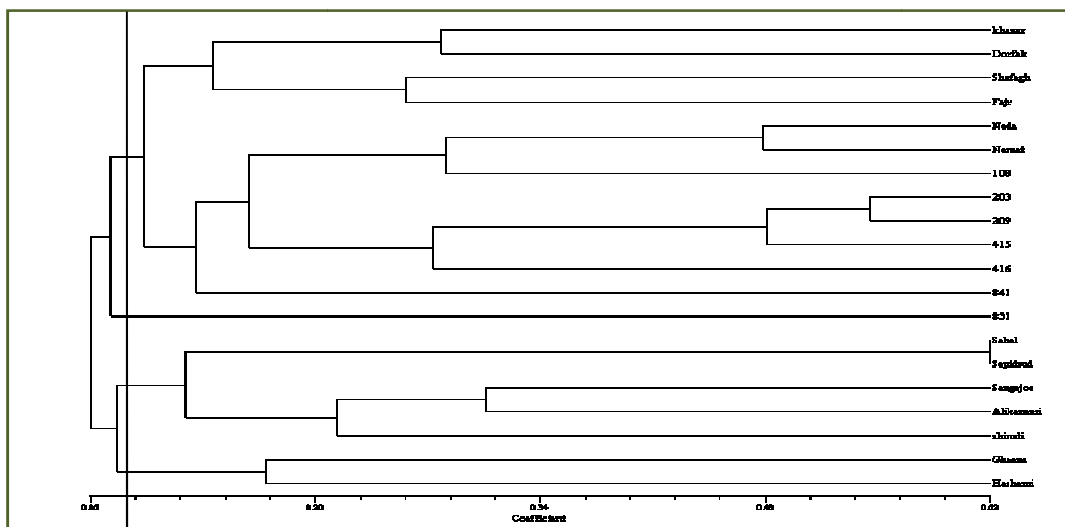
منبع تغییرات	df	SS	MS	درصد واریانس
بین جمعیت	2	1050.352	525.176	80.793
درون جمعیت	17	2122.448	124.850	19.207
کل	19	3172.800	650.026	100

همان‌طور که در جدول ۶ و شکل ۳ مشاهده می‌شود تنوع یا واریانس بین جمعیت‌ها، بیشتر از درون جمعیت‌ها است. علت تنوع بیشتر بین جمعیت‌ها نسبت به تنوع افراد درون جمعیت‌ها این است که افراد درون هر یک از جمعیت‌های مورد مطالعه دارای ماده ژنتیکی همگن‌تری بوده این در حالی است که ماده ژنتیکی بین جمعیت‌ها به‌علت اثرات تنوع والدینی آن‌ها، ذخیره ژنتیکی متفاوتی را نسبت به هم نشان می‌دهند. از طرف دیگر اثرات اقلیمی، اکولوژیکی و جغرافیایی جمعیت‌های مختلف می‌تواند از اثرات محیطی افزایش تنوع ژنتیکی بین جمعیت‌های مورد بررسی باشد.

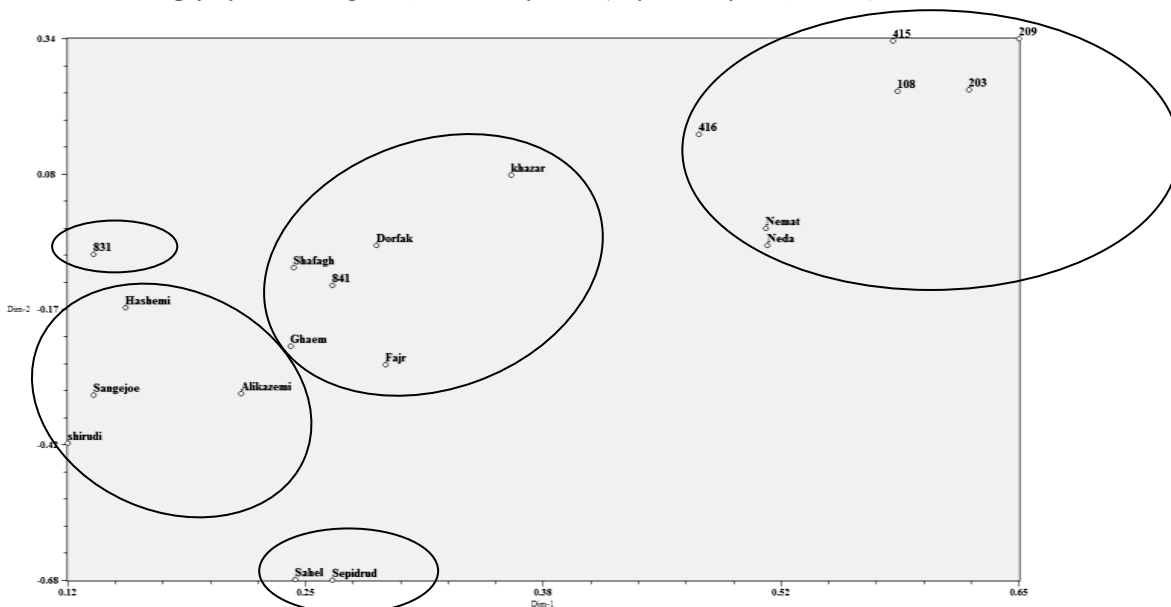
دندروگرام به‌دست‌آمده برای ۲۰ ژنوتیپ برنج با استفاده از ضریب تشابه Jacard ( $r = 0/92$ ) و روش گروه‌بندی UPGMA، براساس فواصل ادغام و ضرایب تشابه، خط برش در نقطه ۰/۱۵ در نظر گرفته شد و ژنوتیپ‌ها را به ۶ گروه تقسیم کرد (شکل ۴). تجزیه به مختصات اصلی (PCOA) به نحوی تاییدکننده تجزیه کلاستر ژنوتیپ‌های برنج

#### 1.Principle Coordinate Analysis

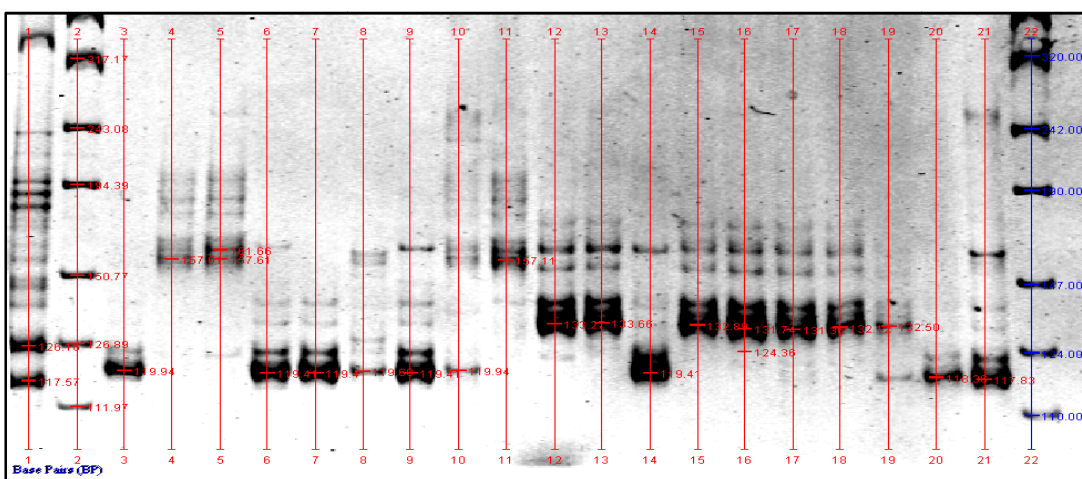




شکل ۴- تجزیه خوشه‌ای ژنوتیپ‌های مورد مطالعه بر اساس داده‌های مولکولی



شکل ۵- پراکنش دوبعدی ژنوتیپ‌های مورد مطالعه با استفاده از فاکتور اول و دوم تجزیه به مختصات اصلی (PCOA)



شکل ۶- الگوی باندهای حاصل از تکثیر DNA ژنومی ژنوتیپ‌های برنج مورد مطالعه، توسط آغازگر RM166.

(چاهک‌های شماره ۲ و ۲۲: Ladder هستند)

کلاستر به‌روش واریانس حداقل وارد، ژنوتیپ‌ها را در محیط بدون تنش در ۳ کلاستر و در محیط تنش در ۴ کلاستر گروه‌بندی کرد (Safaeichaeikar *et al.* 2008).

Sabouri *et al.* (2010) در شناسایی نشانگرهای ریزماهواره پیوسته با ژن‌های کنترل‌کننده تحمل به خشکی از یک جمعیت  $F_2$  شامل ۱۹۲ بوته حاصل از تلاقی دو رقم شاه‌پسند و IR28، برای مکان‌یابی صفات زراعی در شرایط تنش خشکی استفاده نمود و در این مطالعه ناحیه‌ای از کروموزوم شماره یک برنج در فاصله آغازگرهای RM8115-RM5638 و همچنین دو ناحیه روی کروموزوم شماره ۶ در فاصله آغازگرهای RM7434-RM162 و آغازگرهای RM4608-RM217 مشخص شد که چندین صفت را در شرایط تنش خشکی کنترل می‌کردند (Sabouri *et al.* 2011).

Song-ping *et al.* (2007) در بررسی نقشه‌یابی QTL‌های شاخص مقاومت به خشکی در ژنوم گیاه برنج توسط نشانگرهای ریزماهواره از یک مجموعه شامل ۱۹۵ لاین اینبرد نوترکیب (RILs) حاصل از تلاقی بین واریته‌های (Zhenshan97B×IRAT109) موفق به شناسایی ۴ QTL برای شاخص مقاومت به خشکی، موسوم به  $qDRI$  بر کروموزوم‌های ۱، ۴، ۵ و ۹ ژنوم برنج گردید (HU Song-ping *et al.* 2007).

### نتیجه‌گیری کلی

در این تحقیق از صفت عملکرد دانه و به تبع آن شاخص مقاومت به خشکی به‌عنوان داده‌های مورفولوژیکی جهت بررسی ارقام مورد مطالعه در شرایط تنش کم‌آبی استفاده شد، از طرفی از نشانگرهای SSR پیوسته با صفات مرتبط به خشکی و پارامترهای مربوط به آن به‌عنوان داده‌های مولکولی جهت شناسایی تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های

Fukai and Cooper (1995) اظهار نمودند که با تلفیق تحقیقات فیزیولوژیکی و برنامه‌های به‌نژادی می‌توان ژنوتیپ‌های برنج متحمل به خشکی را از روی عملکرد دانه آن‌ها انتخاب نمود، به‌طوری‌که ژنوتیپ‌های متحمل به خشکی عملکرد دانه بالاتری را نسبت به سایر ژنوتیپ‌ها داشته باشند. این محققین همچنین بیان نمودند که دلیل اصلی کسری پیشرفت در اصلاح برای مقاومت به خشکی در برنج، عدم شناسایی دقیق محیط کشت برنج است. به عقیده آن‌ها، ژنوتیپ‌هایی که تحت شرایط کمبود آب، پتانسیل آب برگ خود را در حد بالایی حفظ می‌کنند، بهتر رشد کرده و در نتیجه عملکرد دانه بیشتری نیز تولید می‌کنند. نتایج آزمایش حاضر نیز نشان داد که وضعیت آبی ژنوتیپ‌های برنج، تعیین‌کننده روند واکنشی آن‌ها به تنش کمبود آب است. بنابراین پیشنهاد می‌شود به منظور مطالعه ارقام متحمل برنج، ویژگی‌هایی مانند پتانسیل آبی، پتانسیل اسمزی و محتوای نسبی آب برگ که به‌طور مستقیم در ارتباط با وضعیت آبی گیاه هستند، به‌طور ویژه‌ای موردنظر قرار گیرند. همچنین با توجه به این موضوع که در این تحقیق، کاهش تعداد دانه‌های پر در خوشه تأثیر بیشتری نسبت به سایر اجزای عملکرد در کاهش عملکرد دانه داشت، پیشنهاد می‌گردد که ویژگی‌های روند پرشدن دانه در شرایط تنش کمبود آب مورد مطالعه قرار گیرد.

نتایج تجزیه واریانس SafaeiChaeikar *et al.* (2007) در ارزیابی تحمل ۴۹ ژنوتیپ برنج ایرانی و خارجی به تنش خشکی انتهای فصل، همچون این تحقیق نشان داد که اختلاف بسیار معنی‌داری ( $P < 0.01$ ) بین ژنوتیپ‌های مورد مطالعه از نظر شاخص‌های مقاومت به خشکی و نیز عملکرد در دو شرایط محیطی تنش و بدون تنش وجود داشته و در گروه‌بندی این ۴۹ ژنوتیپ برنج با استفاده از تجزیه

هرچه بهتر از پدیده‌هایی همچون هتروزیس<sup>۲</sup> و تفکیک متجاوز<sup>۳</sup>، در مورد صفات مقاومت به خشکی بهره برد. البته پژوهش حاضر همچون دیگر موضوعات جدید با محدودیت‌های ویژه‌ای روبرو است. کمبود پیشینه پژوهشی در این موضوع و تازه‌بودن آن موجب کمبود منابع مقایسه‌ای گردیده است.

### سپاسگزاری

این پژوهش با حمایت‌های موسسه تحقیقات برنج کشور و دانشگاه پیام نور انجام گردیده است. از تمامی عزیزانی که نگارندگان این مقاله را در انجام این امر یاری نموده‌اند، تشکر و قدردانی می‌گردد.

- 
2. Heterosis
  3. Transgressive segregation

### REFERENCES

- Bernier J, Altin GN, Serraj R, Kumar A, Spaner, D (2007) Review: Breeding upland rice for drought resistance. International Rice Research Institute. 33p.
- Don RH, Cox PT, Wainwright BJ, Mattick JS (1991) Touchdown PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. *Nucleic Acid Research*. 19:4008-4009.
- Fukai S, Cooper M (1995) Development of drought resistant cultivars using physio-morphological traits in rice. *Field Crops Res*. 40: 67-86.
- Jongdee B, Pantuwan G, Fukai S, Fischer K (2006) Improving drought tolerance in rainfed lowland rice: An example from Thailand. *Agric. Water Management*. 80: 225-240.
- Kamoshita A, Babu RC (2008) Phenotypic and Genotypic analysis of drought resistance traits for development of rice cultivars adapted to rainfed environments. *Field Crops Research J*. 109:1-23.
- Kanagaraj P, Silvas K, Babu C (2010) Microsatellite Markers linked to drought resistance in Rice (*Oryza sativa* L.). *Current Science J*. 98:836-839.
- Lafitte HR, Ismail A, Bennet J (2004) Abiotic stress tolerance in rice for Asia: progress and the future, in New directions for a diverse planet: Proceedings of the 4<sup>th</sup> International Crop Science Congress, ed. by Fischer, T., Turner, N., Angus, J., McIntyre, L., Robertson, M., Borrell, A. and Lloyd, D. Brisbane, Australia.
- Lafitte R, Blum A, Atlin G (2003) Using secondary traits to help identify drought-tolerant genotypes. P37-48, In: Fischer, K.S., R. Lafitte., S. Fukai, G. Atlin, B. Hardy. Breeding rice for drought-prone environments. International Rice Research Institute.
- McCouch SR, Teytelman L (2002) Development and Mapping of 2240 new SSR Markers for Rice (*Oryza sativa* L.). *DNA Research*. 9: 199-207. 2002.
- Mohammadi A (2006) Molecular analysis from viewpoint investigate of genetic variation. The 9<sup>th</sup> Iranian crop sciences congress.
- Murray MG, Thompson WF (1980) Rapid isolation of high molecular weight plant. *DNA Nucl. Acids Res*.

- 
1. Marker assistance selection

- 8: 4321-4325.
- Naghavi MR, Ghariazi B, Hosseinisalekdeh G (2005) Molecular Marker. Tehran University Pub., Tehran.
- Sabouri H, Sabouri A, Katami Nejad R (2011). Genetic analysis of agronomic traits in rice under drought stress using Inclusive Composite Interval Mapping. The 7<sup>th</sup> National Biotechnology Congress of I.R. Iran.
- Safaiechaeikar S, Rabiei B, Samizadeh H, Esfahani M (2008) Evaluation of tolerance to terminal drought stress in rice (*Oryza sativa* L.) genotypes. Iranian Journal of Crop Sciences. 9(4): 315-331.
- Song-ping HU, Hua YANG, Gui-hua ZOU, Hong-yan LIU, Guo-lan LIU, Han-wei MEI, Run CAI, Ming-shou LI, Li-jun L UO (2007) Relationship Between Coleoptile Length and Drought Resistance and Their QTL Mapping in Rice. Rice Science. 14(1): 13-20. China National Rice Research Institute.
- Stephenson FH (2003) Calculations in molecular biology and biotechnology, Elsevier.
- Zheng B, Yang L (2008) Mapping QTLs for morphological traits under two water supply conditions at the young seedling stage in rice. Plant Science Journal. 175: 767-776.

