Crop Biotech.
Summer (2019) 8(4):1-18. DOI: 10.30473/cb.2019.45192.1773

مجله علمی ـ پژوهشی زیست‌فناوری گیاهان زراعی
سال هشتم، پیاپی چهارم، شماره بیست‌وششم، تابستان ۱۳۹۸ (۱-۱۸)

بررسی تنوع و ویژگی‌های ژنتیکی تعدادی از توده برنج رقم هاشمی با استفاده از صفات مورفولوژیک و نشانگرهای ریزماهواره

آیدا دررشته[۱]، علیرضا ترنگ[۲*]
۱. دانشجوی کارشناسی‌ارشد ژنتیک، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تنکابن، تنکابن، ایران
۲. استادیار پژوهش، مؤسسه تحقیقات برنج کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، رشت، ایران
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۱۱/۲ - تاریخ تصویب: ۱۳۹۸/۳/۹)

Evaluation of genetic diversity and genetic characteristics of some of Hashemi rice cultivars using morphological traits and microsatellite markers

Ayda Dorreshteh[1], Alireza Tarang[2*]
1. M.Sc. Student, Department of Science, Islamic Azad University of Tonekabon, Tonekabon, Iran
2. Assistant Professor, Rice Research Institute of Iran, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Rasht, Iran
(Received: Jun. 22, 2019 - Accepted: May 30, 2019)

چکیده

برنج مهم‌ترین منبع غذایی بیش از نیمی از جمعیت جهان است. برنج هاشمی در حال حاضر در استان گیلان بیشترین میزان سطح زیر کشت را داشته و از لحاظ کیفیت پخت و مشتری پسندی بهتر از سایر ارقام می باشد. در این تحقیق به‌منظور بررسی تنوع ژنتیکی موجود در ۲۰ توده محلی برنج هاشمی به‌همراه ارقام شاهد گوهر و هاشمی (معرفی‌شده توسط مؤسسه تحقیقات برنج کشور)، از ۲۱ نشانگر ریزماهواره، صفات مورفولوژیک و کیفیت دانه استفاده شد. نتایج نشان داد که تمامی صفات مورد مطالعه دارای اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد بودند. تجزیه خوشه‌ای با کمک نرم‌افزار R، ژنوتیپ‌های مورد مطالعه را به ٤ گروه تقسیم کرد. بر اساس اطلاعات حاصل از نشانگرها در مجموع ۹٦ آلل چند شکل با میانگین ٤/٥٧ آلل به‌ازای هر جفت آغازگر تکثیر شد. کمترین تعداد مربوط به نشانگر RM249 با ۳ آلل و بیشترین آن به‌ترتیب مربوط به نشانگرهای RM19 و RM1109 با ٦ آلل بود. میانگین تعداد آلل مؤثر ۳/۹۷ بود که RM249 با داشتن مقدار ۲/۲٥ کمترین و نشانگرهای RM413 و RM1109 با داشتن مقادیر ٥/٦٥ و ٥/۲۱ بیشترین مقادیر را دارا بودند. میانگین محتوای اطلاعات چند شکل (PIC) بدست آمده برای نشانگرهای ریزماهواره، ٠/٦۹ بود. در تجزیه‌ی خوشه‌ای با ضریب تشابه جاکارد بر اساس نشانگرهای ریزماهواره، ژنوتیپ‌ها در ٤ کلاستر طبقه‌بندی شدند. در مجموع نتایج تجزیه خوشه‌ای صفات مورفولوژیک و نشانگرهای ریزماهواره با هم مطابقت خوبی داشتند و توانستند افراد را بر اساس منشأ جغرافیایی خود گروه‌بندی نمایند. وجود تنوع ژنتیکی در توده‌های محلی برنج هاشمی، امکان خالص‌سازی و گزینش لاین‌های برتر، حفظ و استفاده از ژنوتیپ‌های مختلف را در برنامه‌های اصلاحی فراهم می‌کند.

واژه‌های کلیدی: برنج هاشمی، ریزماهواره، تجزیه‌ی خوشه‌ای.

Abstract

Rice is the most important source of food for more than half of the world's population. Currently, Hashemi rice has the highest area under rice in Guilan province and is better than other varieties in terms of cooking quality and customer satisfaction. In this study, for the study the genetic diversity of 20 Hashemi cultivars genotypes and two varieties as control (Hashemi and gowhar-introduced by the Rice Research Institute of Iran), 21 polymorphic markers, morphological traits and grain quality were used. The results showed that all of studied traits had a significant difference at 1% level. The cluster analysis with the help of software R divided the studied genotypes into four groups. Based on the data from 21 markers, in total, 96 alleles were detected with the average of 4.57 alleles per locus. The highest number of alleles was observed in markers RM19 and RM1109 with 6 alleles and minimum number of alleles in marker RM249 with 3 alleles. The average number of effective alleles was 3.97. The RM249 had the lowest value of 2.25 and the RM413 and RM1109 markers had the highest values of 5.65 and 5.21, respectively. The average value of polymorphic information content (PIC) was 0.69 for SSR markers. Based on cluster analysis by using Jaccard coefficient and UPGMA method on the SSR markers, the genotypes were grouped in 4 clusters. In general, the results of cluster analysis of morphological traits and microsatellite markers were in good agreement and they could group individuals based on their geographical origin. Understanding the genetic diversity can further help to breeders in their breeding programs, especially in purification the best genotypes and preserving these genotypes in Iran's rice gene bank.

Keywords: Cluster analysis, Hashemi rice cultivar, Microsatellite.

* نویسنده مسئول: علیرضا ترنگ
E-mail: a_tarang@hotmail.com

مقدمه

برنج غذای اصلی نیمی از مردم جهان است و تقریباً ۱۱٪ از زمین‌های قابل زراعت، سالیانه زیر کشت برنج می‌روند (Naravaneni & Chakravarthi, 2006). برنج گیاه زراعی مناطق گرم‌سیری و مرطوب است که در همه قاره‌ها (به‌جز مناطق یخبندان) در عرض جغرافیایی ۵۳ درجه شمال تا ۴۰ درجه جنوب خط استوا کشت می‌شود (Fathi, 1998). این محصول یک سوم سطح زیر کشت غلات دنیا را به‌خود اختصاص داده است و تأمین‌کننده ۳۵ تا ۶۵ درصد کالری ۲/۷ میلیارد نفر از جمعیت جهان می‌باشد و بیش از ۹۰٪ برنج دنیا در آسیا تولید می‌شود (Luh, 2013). این غله ۲۰٪ از انرژی تغذیه‌ای جهان را تامین می‌کند در حالی‌که گندم ۱۹٪ و ذرت ۵٪ از این سهم را دارا می‌باشد (Bandumula, 2018). برنج حاوی مواد ریزمغذی مثل روی، آهن، تیامین، ریبوفلاوین و نیاسین می‌باشد (Kennedy and Burlingame, 2003) و غذای اصلی مردم ایران با سرانه ۳۸ کیلوگرم درسال است (Kordrostami *et al*., 2016). بیش از ۹۰ درصد سطح زیر کشت برنج کشور به استآن‌های شمالی (گیلان، مازندران و گلستان)، استآن‌های فارس، خوزستان و اصفهان که مهم‌ترین استآن‌های تولیدکننده برنج در کشور می‌باشند، تعلق دارد. سه استان شمالی کشور در مجموع حدود ۸۰ درصد سطح زیر کشت برنج کشور را دارا می باشند (Akbarpour *et al*., 2016; Tarang and Bakhshipour, 2013). رقم برنج محلی هاشمی، به‌دلیل داشتن خصوصیات ظاهری مناسب و کیفیت پخت عالی، نسبت به سایر ارقام محلی برنج محبوبیت بیشتری دارد و کشاورزان کشت این رقم را به سایر رقم‌های برنج ترجیح می‌دهند. رقم محلی هاشمی که حاصل انتخاب از توده محلی برنج بوده است، در سطح وسیعی از شالیزارهای کشور کشت می‌شود، اما تنوع زیادی در این رقم مشاهده می‌شود و به‌نظر می‌رسد آن‌چه که به نام رقم هاشمی مورد کشت و کار قرار می‌گیرد، در واقع یک توده محلی برنج شامل مخلوطی از ژنوتیپ‌های مختلف است. از طرفی کشاورزان برای کشت ارقام محلی برنج از بذرهای خودمصرفی استفاده می‌کنند و همین عامل موجب ایجاد تنوع و ناخالصی در بذر این رقم شده است. ازطرفی عوامل محیطی نقش زیادی در به‌وجودآمدن تنوع مورفولوژیک دارند و از این‌رو برای آگاهی از تنوع ژنتیکی موجود در جمعیت‌ها ،اغلب تنوع مولکولی در سطح ژنوم مورد ارزیابی قرار می‌گیرد (Tarang and Gashti, 2016; Tarang and Hosseini, 2017). از اقدامات اساسی که قبل از انجام هر برنامه اصلاحی باید مورد توجه قرار گیرد دستیابی به تنوع ژنتیکی موجود است (Virmani, 2012). تعیین میزان تنوع ژنتیکی در مواد گیاهی برای شناسایی، حفظ و نگهداری ذخایر توارثی و برای انجام تحقیقات ژنتیکی و برنامه‌های اصلاحی مورد نیاز می‌باشد (Verma and Kumar, 2017). دانش کافی و کامل از تنوع ژنتیکی اصلاح‌گران را قادر به انتخاب منابع والدی مناسب در جهت ایجاد جمعیت متنوع از نظر ژنتیکی می‌سازد. چندین روش برای ارزیابی تنوع ژنتیکی در گیاهان وجود دارد که یکی از آن‌ها به‌کارگیری مارکرهای مولکولی است. مارکرهای مولکولی در کاهش سایز جمعیت در جهت اندازه‌گیری میزان تنوع در مراحل اولیه مفید خواهند بود (Xu, 2010). تا کنون محققان زیادی در خصوص تنوع مولکولی ژرم‌پلاسم‌های مختلف برنج بررسی‌های زیادی انجام داده‌اند. چندشکلی ۲۷ نشانگر ریزماهواره پیوسته با مکآن‌های ژنی کنترل‌کننده کیفیت دانه در بین ۴۷ ژنوتیپ برنج توسط Tabkhkar و همکاران (۲۰۱۲) مورد بررسی

قرار گرفت. میانگین شاخص اطلاعات چندشکلی (PIC) و شاخص تنوع شانون به‌ترتیب برابر با ۰/۵۴ و ۱/۱۴ به‌دست آمد. تجزیه خوشه‌ای به‌روش UPGMA، ژنوتیپ‌ها را به ۴ گروه تقسیم کرد. نتایج نشان داد که تنوع ژنتیکی مطلوب بین کلیه ژنوتیپ‌ها از نظر این جایگاه‌های ریزماهواره وجود دارد. در تحقیق دیگر Chamani و همکاران (۲۰۱۲) به‌منظور تعیین ارتباط ژنتیکی بین ۹ لاین والدینی برنج شامل ۴ لاین ایرانی و ۵ لاین از مرکز تحقیقات بین‌المللی برنج (International Rice Research Institute) و ۲۰ هیبرید حاصل ازآن‌ها، تعداد ۲۴ نشانگرSSR استفاده شد. از بین ۲۴ آغازگر، ۱۸ آغازگر در بین والدین باندهای چندشکل تولید کردند و در مجموع ۵۱ آلل چندشکل تولید شد. تعداد آلل برای هر آغازگر از ۲ تا ۶ متغیر بود و میانگین تعداد آلل هر آغازگر ۲/۷۱ بود. ۳۶ رقم برنج با استفاده از ۱۰۳ نشانگر ILP و ۵۴ نشانگر SSR توسط Ming و همکاران (۲۰۱۰) ارزیابی و در مجموع ۲۳۶ و ۳۳۱ آلل به ترتیب برایILP و SSR شناسایی شد. نتایج نشان داد که میزان چندشکلی و فاصله ژنتیکی اندازه‌گیری شده در نشانگر ریزماهواره بیشتر از ILP بود. این محققین پیشنهاد کردند که نشانگر SSR می‌تواند نشانگرمفیدی برای اصلاح ژنتیکی و تولید هیبرید در برنج باشد. در تحقیقی که توسط Phetmanyseng و همکاران (۲۰۱۰) به‌منظور ارزیابی ارتباط بین فاصله ژنتیکی و مقدار هتروزیس در برنج‌های ایری و لائوس انجام گرفت، به این نتیجه رسیدند که بین عملکرد هیبریدها و فاصله ژنتیکی والدین بر مبنای نشانگرهای SSR ارتباط خطی قابل توجهی وجود دارد. در بررسی یک جمعیت متشکل از ۱۲۸ ژنوتیپ برنج که از نقاط مختلف چین جمع‌آوری شده بودند، برای ۱۱ صفت زراعی در طول ۲ سال با استفاده از ۱۵۲ نشانگر ریزماهواره که سراسر ژنوم را پوشش می‌دادند، در کل ۱۶ نشانگر ارتباط خود را با صفات به‌صورت معنی‌دار نشان دادند. محققین بیان کردند که استفاده از تجزیه ارتباط برای بررسی ژنوتیپ‌های مختلف برنج در روند برنامه‌های اصلاحی مفید و کارآمد خواهد بود (Zhou *et al.*, 2012). تنوع ژنتیکی، نقش بسیار مهمی در پیشبرد برنامه‌های اصلاحی و حفاظت از منابع ژنتیکی در زمینه برآورد محصولات زراعی دارد که از طریق صفات مورفولوژیکی، بررسی شجره‌ها و نشانگرهای مولکولی میسر می‌گردد. از جهتی، تا کنون تنوع موجود در توده محلی هاشمی که در نقاط مختلف استان گیلان کشت می‌شود، مورد بررسی قرار نگرفته است. از این‌رو، پژوهش حاضر با هدف بررسی تنوع مولکولی بین توده‌های محلی هاشمی جمع‌آوری‌شده از مناطق مختلف استان گیلان و دسته‌بندی ژنوتیپ‌هایی که به نام رقم هاشمی کشت می‌شوند، انجام شد.

مواد و روش‌ها

برای انجام این پژوهش، ابتدا بذور ۲۰ توده محلی که به نام برنج هاشمی در مناطق مختلف استان گیلان شناخته می‌شدند، به همراه ارقام گوهر و هاشمی (معرفی‌شده توسط مؤسسه تحقیقات برنج کشور) به‌عنوان شاهد، جمع‌آوری شدند (جدول ۱). جمع‌آوری این ژنوتیپ‌ها به صورت خوشه و در مزرعه تحقیقاتی مؤسسه تحقیقات برنج کشور در سال زراعی ۱۳۹۶ انجام و به هر کدام از ژنوتیپ‌ها یک کد (از ۱ تا ۲۲) اختصاص داده شد. در سال زراعی دوم (سال ۱۳۹۷) خوشه‌های هر ژنوتیپ در خزانه کشت و سپس در مزرعه اصلی در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی در سه تکرار نشا شدند. مراقبت‌های مزرعه‌ای در طول فصل زراعی مطابق روش رایج منطقه انجام شد. در طول فصل زراعی، بوته‌های خارج از تیپ در هر کرت دقیقاً شناسایی و با حذف آن‌ها، ژنوتیپ‌ها خالص‌سازی شدند. در ضمن از هر ژنوتیپ در مرحله

حداکثر پنجه‌دهی، نمونه‌های برگی مناسب جهت استخراج DNA ژنومی تهیه شد. همچنین در طول دوره رشد و در هنگام برداشت صفات مورفولوژیک اندازه‌گیری شدند. برای اندازه‌گیری ارتفاع بوته، طول ساقه اصلی پس از خوشه‌دهی در ۱۰ بوته تصادفی از سطح خاک تا نوک بلندترین خوشه به سانتی‌متر در هر کرت اندازه‌گیری شد و سپس میانگین آن‌ها برای تجزیه‌های آماری مورد استفاده قرار گرفت. تعداد خوشه بارور و قابل برداشت در ۱۰ بوته تصادفی از هر کرت و در مرحله خمیری شدن دانه، شمارش و میانگین آن‌ها ثبت شد. برای سنجش وزن هزاردانه، وزن کل دانه‌های پر خوشه‌های اصلی در ۱۰ بوته تصادفی به‌وسیله ترازوی حساس با دقت یک هزارم گرم اندازه‌گیری شد و سپس به وزن هزاردانه تبدیل شد. اندازه طول خوشه مربوط به پنجه اصلی از گره زیر خوشه در ۱۰ بوته تصادفی هر کرت در مرحله خمیری‌شدن دانه‌ها، اندازه‌گیری و میانگین آن‌ها ثبت شد. تعداد روز از زمان کاشت بذر در خزانه تا زمان رسیدن کامل خوشه‌های هر کرت برای صفت رسیدن کامل ثبت شد. عملکرد دانه با حذف حاشیه برحسب کیلوگرم در هکتار با احتساب ۱۴ درصد رطوبت اندازه‌گیری شد. برای سنجش طول و عرض دانه از دستگاه کولیس استفاده و موارد بر حسب میلی‌متر گزارش گردیدند. همچنین صفات کیفیت پخت دانه مانند مقدار آمیلوز (درصد) به روش جولیانو (Juliano, 1971) و قوام ژل برنج به‌روش Cagampang و همکاران (۱۹۷۳) اندازه‌گیری شد. استخراج DNA از نمونه‌های برگی به‌روش CTAB انجام شد (Murray and Thompson, 1980). به‌منظور ارزیابی تنوع مولکولی ژنوتیپ‌های مورد مطالعه از ۲۱ نشانگر SSR استفاده شد. این نشانگرها بر اساس صفات مرتبط با صفات عملکرد و کیفیت دانه از پایگاه اطلاعاتی گرامینه بر مبنای ارتباط آن‌ها با QTLهای شناخته‌شده و بزرگ‌اثر (McCouch *et al*., 2002) انتخاب و توالی آن‌ها از همین پایگاه تهیه شد (جدول ۲). عمل رقیق‌سازی DNA به‌کمک دستگاه نانودراپ اسپکتروفوتومتر NANODROP2000 Thermoscientific انجام شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) در حجم ۱۰ میکرولیتر شامل ۳/۸ میکرولیتر محلول مادری (شرکت سیناکلون) و آغازگر مستقیم و معکوس هریک با غلظت ۱۰ پیکومول در میکرولیتر به‌میزان ۰/۵ میکرولیتر بود که به تیوب‌های محتوای ۳ میکرولیتر DNA الگو با غلظت ۱۰ نانوگرم در میکرولیتر اضافه شد و سپس با آب مقطر به حجم ۱۰ میکرولیتر رسید. به تیوب‌ها مقدار ۱۲ میکرولیتر روغن معدنی اضافه شد و بلافاصله به دستگاه ترموسایکلر ABI, Applied Biosystems منتقل شدند. برنامه حرارتی PCR شامل یک چرخه واسرشته‌سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه سیلسیوس به‌مدت ۴ دقیقه و سپس ۳۵ چرخه شامل واسرشته‌سازی در دمای ۹۴ درجه سیلسیوس به‌مدت ۴۵ ثانیه، اتصال آغازگر در دمای ۵۵-۶۵ درجه سیلسیوس به‌مدت ۴۵ ثانیه و بسط در دمای ۷۲ درجه سیلسیوس به‌مدت ۲۵ ثانیه بود که در انتها بسط نهایی به‌مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سیلسیوس انجام شد. محصولات به‌دست‌آمده از PCR به‌منظور مشاهده نحوه تکثیر DNA و الگوی نواری ایجادشده، روی ژل‌های پلی‌اکریل‌امید ۱۰ درصد منتقل و الکتروفورز آن‌ها با ولتاژ ثابت ۱۴۰ولت به‌وسیله دستگاه الکتروفورز عمودی BioRAD انجام شد. برای مشاهده نوارهای ایجاد شده به‌وسیله ژنوتیپ‌های مختلف از روش رنگ‌آمیزی نیترات نقره استفاده شد. سپس به‌منظور بررسی نتایج، ژل در دستگاه ژل داک Bio DOC Analyzer Biometrat مورد مشاهده قرار گرفت.

تجزیه واریانس داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS نسخه ۹/۲ انجام شد. برای بررسی میزان شباهت‌ها و تفاوت‌های بین ژنوتیپ‌های مورد مطالعه از نظر کلیه صفات مورفولوژیک، تجزیه خوشه‌ای به روش‌های نزدیک‌ترین همسایه‌ها، دورترین همسایه‌ها، UPGMA و حداقل واریانس Ward انجام شد و چون روش UPGMA دارای بیشترین ضریب همبستگی کوفنتیک و بهترین شکل دندروگرام (عدم وجود حالت پله‌ای یا زنجیره‌ای) بود، این روش انتخاب شد. برش دندروگرام جهت گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها بر اساس بیشترین فاصله بین دو ادغام متوالی انجام و سپس صحت گروه‌بندی حاصل با تجزیه تابع تشخیص ارزیابی شد. هر دو تجزیه خوشه‌ای و تابع تشخیص با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۲ انجام شد. برای نشانگر ریزماهواره نیز ابتدا الگوی باندی مشاهده شده در ژل‌های پلی‌آکریل‌آمید بر مبنای وجود یا فقدان باند به‌ترتیب با اعداد یک و صفر مرتب شده و داده‌ها به صورت یک ماتریس ۹۶×۲۲ وارد نرم‌افزار Excel شدند که در آن عدد ۹۶ نشان‌دهنده تعداد آلل مشاهده شده و عدد ۲۲ تعداد ژنوتیپ‌های مطالعه شده بود. به‌منظور گروه‌بندی ارقام بر اساس داده‌های مولکولی نیز از نرم‌افزار R استفاده و تجزیه خوشه‌ای بر مبنای ضریب تشابه جاکارد و روش UPGMA که بیشترین ضریب همبستگی کوفنتیک و بهترین شکل دندروگرام را از نظر عدم وجود حالت پله‌ای داشت، انجام شد. تعداد آلل مؤثر، تنوع ژنی نئی (He) و محتوای اطلاعات چندشکل (PIC) برای هر نشانگر با استفاده از نرم‌افزار POPGEN نسخه ۱/۳۲ توسط روابط ۱ و ۲ محاسبه شد:

$$H_e = 1 - \sum_{i=1}^{n} p_i^2 \qquad (۱)$$

$$PIC = 1 - \sum_{i=1}^{n} p_i^2 - \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^{n} p_i^2 p_j^2 \qquad (۲)$$

در این روابط، pi و pj به‌ترتیب فراوانی آلل‌های i و j و n تعداد آلل‌های مشاهده شده برای هر نشانگر در جمعیت است.

جدول ۱. مشخصات توده‌های برنج هاشمی در این تحقیق

Table 1. Characteristics of Hashemi rice landraces in current study

Code	Location	Province
Kh1	Siahmezgi	Guilan
Kh2	Komachal	Guilan
Kh3	Penchah	Guilan
Kh4	Vishkananak	Guilan
Kh5	Verazkah	Guilan
Kh6	Bazghalee	Guilan
Kh7	Espand	Guilan
Kh8	Chomesghal	Guilan
Kh9	Atashgah	Guilan
Kh10	Bijarpas	Guilan
Kh11	Jomeebazar	Guilan
Kh12	Siahdarvishan	Guilan
Kh13	Nargestan	Guilan
Kh14	Koochkam	Guilan
Kh15	Sarbandan	Guilan
Kh16	Jirdeh	Guilan
Kh17	Balasbaneh	Guilan

Kh18	katesar	Guilan
Kh19	Hashemi from Rice Research Institute of Iran	Guilan
Kh20	Gohar (check)	Guilan
Kh21	Naserkiade	Guilan
Kh22	Moridan	Guilan

جدول ۲. مشخصات آغازگرهای استفاده شده در این تحقیق

Table 2. Characteristics of Primers used in this study

Primer	Motif	Chromosom	Annealing temperature (°C)	Forward primer sequence	Reverse primer sequence
				GAACCAGAGGACAAAAATGC	CATCATACATTTGCAGCCAG
RM111	9(GA)	6	55	CACAACCTTTGAGCACCGGGTC	ACGCCTGCAGCTTGATCACCGG
RM231	16(CT)	3	55	CCAGATTATTTCCTGAGGTC	CACTTGCATAGTTCTGCATTG
RM19	10(ATC)	12	55	CAAAAACAGAGCAGATGAC	CTCAAGATGGACGCCAAGA
RM234	25(CT)	7	55	ACAGTATCCAAGGCCCTGG	CACGTGAGACAAAGACGGAG
RM241	31(CT)	4	55	GAGCCAAATAAGATCGCTGA	TGCAAGCAGCAGATTTAGTG
RM249	5A2(AG) 14(AG)	5	55	GGCGTAAAGGTTTTGCATGT	ATGATGCCATGAAGGTCAGC
RM402	7(ATA)	6	55	GAGCCATGGAAAGATGCATG	TCAGCTGGCCTATGACAATG
RM413	11(AG)	5	55	GGCGATTCTTGGATGAAGAG	TCCCCACCAATCTTGTCTTC
RM279	16 (GA)	2	55	GCGGGAGAGGGATCTCCT	GGCTAGGAGTTAACCTCGCG
RM505	34(TA)	7	55	CGTAGGTGATATATTGATCC	GTTCAAATTTTAACTAGCCA
RM6643	9(GA)	9	50	TGGTGTTATTCCGAGGCTTC	GAGAGAGAGAGGAGATTTTGGG
RM1109	12(AG)	8	55	TCAAAATCACGTGTATGTAAGC	TTTACAAAGGACAGAGGGC
RM1141	12(AG)	1	55	TGCATTGCAGAGAGCTCTTG	CAGGGCTTTGTAAGAGGTGC
RM1024	13(AC)	5	55	GCATATACCATGGGGATTGG	GGGATTGGGATAATGGTGTG
RM3337	15(CT)	4	50	TCCCCAATTATATCCCCTCC	GATTGGGGGAAGAGGAAGAG
RM215	16(CT)	9	55	CAAAATGGAGCAGCAAGAGC	TGAGCACCTCCTTCTCTGTAG
RM441	13(AG)	11	55	ACACCAGAGAGAGAGAGAGAGAG	TCTGCAACGGCTGATAGATG
RM510	15(GA)	6	55	AACCGGATTAGTTTCTCGCC	TGAGGACGACGAGCAGATTC
RM474	13(AT)	10	55	AAGATGTACGGGTGGCATTC	TATGAGCTGGTGAGCAATGG
RM219	17(CT)	9	55	CGTCGGATGATGTAAAGCCT	CATATCGGCATTCGCCTG

نتایج و بحث

متوسط دامنه تغییرات طول خوشه از ۲۴/۷ سانتی‌متر تا ۳۰/۸ سانتی‌متر متغیر بود که نشان‌دهنده تنوع بالایی در توده‌های مورد بررسی می‌باشد. متوسط ارتفاع بوته در توده‌های مورد ارزیابی دارای دامنه تغییرات بالایی بود به طوری که کوتاه‌ترین توده ۱۰۰ سانتی متر و بلندترین توده ۱۳۸ سانتی متر طول داشت. این تنوع بالا در ارتفاع بوته می‌تواند در برنامه‌های اصلاحی برای تولید ارقام دارای ارتفاع مناسب برنج مورد استفاده قرار بگیرد. تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که ژنوتیپ‌های مورد مطالعه از نظر کلیه صفات بررسی شده در سطح یک درصد دارای اختلاف معنی‌داری با هم بودند (جدول ۳). مقادیر حداقل، حداکثر، میانگین، انحراف معیار و ضریب تغییرات فنوتیپی برای صفات مورد بررسی در جدول ۴ آورده شده است. طبق جدول ۴ از نظر کلیه صفات مورد ارزیابی، تنوع قابل توجهی در میان ژنوتیپ‌ها مشاهده شد. در میان صفات مختلف بیشترین میزان تنوع فنوتیپی مربوط به صفات قوام ژل، تعداد پنجه و درصد برنج سالم به‌ترتیب با مقدار ۲۵/۲، ۲۰/۵ و ۲۰/۵ بود. بنابراین در مورد این صفات می‌توان گفت که منابع ژنتیکی خوبی برای استفاده در برنامه‌های اصلاحی برنج برای بهبود این صفات وجود دارد. از نظر صفت تعداد روز تا رسیدن کامل بین زودرس‌ترین و دیررس‌ترین ژنوتیپ ۱۶ روز اختلاف وجود داشت که کمترین درصد تنوع محاسبه شده بین صفات مورد مطالعه را دارا بود. ضریب تغییرات برای صفات مختلف از ۲/۹ تا ۲۵/۲ درصد متغیر بود. همچنین برای صفت عملکرد یک اختلاف ۱/۴ تنی بین کمترین عملکرد (۳/۹) و بیشترین عملکرد (۵/۳)

وجود داشت که نشان دهنده تنوع نسبتا خوب برای این صفت در بین توده‌های مورد مطالعه می‌باشد که می‌توان از آن در برنامه‌های اصلاحی استفاده نمود.

در این تحقیق مشخص گردید که بین گروه‌های مختلف ایجادشده در بین ژنوتیپ‌های برنج بر مبنای صفات مورد مطالعه تنوع ژنتیکی وجود دارد و می‌توان از تلاقی آن‌ها در برنامه‌های دورگ‌گیری ژنوتیپ‌های برنج مطلوب را به‌دست آورد.

برای بررسی میزان شباهت‌ها و تفاوت‌های بین توده‌های مورد مطالعه از نظر کلیه صفات، تجزیه خوشه‌ای ژنوتیپ‌ها به روش‌های مختلف شامل متوسط فاصله بین و درون گروه‌ها، نزدیکترین و دورترین همسایه‌ها و روش UPGMA انجام شد و گروه‌بندی حاصل از آن‌ها مورد مقایسه قرار گرفت. از آنجایی که روش UPGMA بیشترین ضریب همبستگی کوفنتیک و بهترین شکل دندروگرام را ارایه داد، از این‌رو تنها نتایج این روش گزارش شد. بر این اساس، ژنوتیپ‌های مورد بررسی در چهار گروه اصلی دسته‌بندی شدند (شکل ۱). نخستین گروه، شامل یک ژنوتیپ بود (Kh20). ژنوتیپ مزبور رقم گوهر می‌باشد. رقم گوهر یک رقم خارجی بوده که از تلاقی Pusa 1238-1 (پایه مادری) و Pusa1238-81-6 (پایه پدری) به‌وجود آمده و چندین سال در ایران کشت می‌شود. با توجه به داده‌های جدول ۴ در می‌یابیم که رقم مورد نظر نسبت به سایر توده‌ها بسیار پاکوتاه و همچنین دارای بیشترین عملکرد دانه بوده است. از نظر تعداد خوشه نیز جزو بهترین‌ها بوده و دارای بیشترین تعداد خوشه بود. اما تنها نکته منفی این رقم دیررسی آن بود که با ۱۳۲ روز تا رسیدن کامل، نسبت به سایر توده‌های مورد مطالعه دیررس‌تر بود. همچنین با مطالعه صفات کیفیت دانه در می‌یابیم که این رقم دارای بیشترین مقدار برای صفات قوام ژل و محتوای آمیلوز بود. رقم اصلاح شده گوهر از نظر ژنتیکی منشا خارجی دارد به همین دلیل جدا شدنش از بقیه طبیعی‌است و قابل پیش بینی می‌باشد. در گروه دوم تعداد ۵ توده هاشمی (Kh13، Kh6، Kh16، Kh22 و Kh21) با یکدیگر در یک گروه قرار گرفتند. این توده‌ها به‌ترتیب از نواحی نرگستان، بازقلعه، جیرده، ناصرکیاده و مریدان بودند. با توجه به جدول ۴ مقایسه میانگین صفات در می‌یابیم که این گروه از نظر تعداد پنجه و طول و عرض دانه دارای بیشترین مقادیر بودند. همچنین با توجه به صفت رسیدن کامل دانه در می‌یابیم که این گروه نسبت به سایر توده‌ها متوسطرس بودند.

جدول ۳. تجزیه واریانس صفات مورفولوژیک و کیفیت دانه مورد مطالعه در توده‌های برنج هاشمی

Table 3. Analysis of variance for the studied morphological and grain quality traits in Hashemi rice landraces

Source of variation	df	Mean sequares					
		Grain yield (kg/ha)	Plant height (cm)	Panicle No.	Panicle length (cm)	Grain length (mm)	Grain width (mm)
Genotype	21	0.29**	188.55**	14.85**	8.65**	2.25**	2.52**
Replication	2	1.16**	32.02**	12.25**	4.25**	0.16**	0.09**
Error	42	0.0001	4.51	1.75	1.78	0.0001	0.0001
CV (%)		0.03	9.68	4.83	6.62	0.05	0.03

ns و **: غیر معنی‌دار و معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد

ns, **: Non-significant and significant at 1% of probability levels, respectively.

ادامه جدول ۳. تجزیه واریانس صفات مورفولوژیک و کیفیت دانه مورد مطالعه در توده‌های برنج هاشمی

Continued table 3. Analysis of variance for the studied morphological and grain quality traits in Hashemi rice landraces

Source of variation	d.f.	Mean sequares					
		1000-grain weight (gr)	Head rice (%)	Days to maturity	Amylose content (%)	Gel consistency (mm)	Elongation (mm)
Genotype	21	3.67**	98.44**	54.26**	5.19**	2.25**	3.25**
Replication	2	10.87**	32.00**	22.25**	4.41**	1.10**	0.02**
Error	42	2.51	6.72	4.46	1.62	0.0001	0.0001
CV (%)		6.67	10.65	9.95	1.73	0.03	0.004

ns و **: غیر معنی‌دار و معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد

ns, **: Non-significant and significant at 1% of probability levels, respectively.

جدول ۴. آماره‌های توصیفی صفات مورد مطالعه

Table 4. Descriptive statistics of studied traits

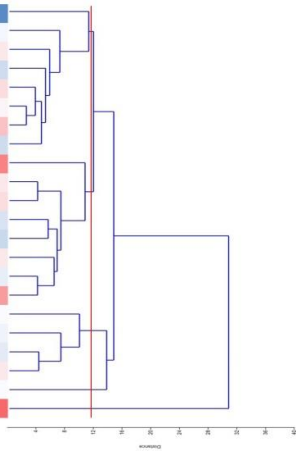
Traits	Domain	Minimum	Maximum	Mean	Variance	CV (%)
Grain yield (kg/ha)	1.4	3.9	5.3	4.40	0.10	7.10
Plant height (cm)	38	100	138	124.77	62.85	6.29
Panicle No.	4.7	10/3	15	12.45	1.62	10.47
Panicle length (cm)	6.1	24.7	30.8	28.29	2.88	5.86
Grain Length (mm)	1.1	6.7	7.8	7.16	0.05	3.24
Grain Width (mm)	0.6	1.7	2.3	1.95	0.03	9.15
1000-grain Weight (gr)	6.5	24	30.5	28.20	3.62	6.57
Head rice (%)	22	43.4	65.4	54.11	32.80	10.52
Days to maturity	16	116	132	119.23	11.42	2.85
Amylose content (%)	5.8	18.5	24.3	20.95	1.73	6.31
Gel consistency (mm)	2.8	3.7	6.5	4.19	0.37	2.52
Elongation (mm)	0.41	1.55	1.96	1.68	0.01	5.02

گروه سوم شامل ۸ توده هاشمی بود (Kh8، Kh18، Kh15، Kh17، Kh11، Kh12، Kh14). این توده‌ها به‌ترتیب از نواحی چمثقال، کته‌سر، شقاجی، سربندان، بلسنبه، جمعه‌بازار، سیاه‌درویشان و کوچکام بودند. همچنین رقم شاهد هاشمی از مؤسسه تحقیقات برنج کشور نیز در این گروه قرار گرفت (Kh19). نکته جالب توجه این بود که اکثر توده‌های منطقه صومعه‌سرا در این گروه قرار گرفتند. از جهت دیگر، با توجه به جدول ۵، درمی‌یابیم که اکثر این توده‌ها برای بیشتر صفات مورفولوژیک و کیفیت دانه در حد وسط توده‌های مورد مطالعه قرار داشتند. در گروه آخر نیز ۸ توده در کنار یکدیگر قرار گرفتند (Kh3، Kh4، Kh10، Kh7، Kh1، Kh5، Kh9 و Kh2). در این گروه، دو توده جمع‌آوری‌شده از آستانه، دو توده جمع‌آوری‌شده از سنگر و دو توده جمع‌آوری شده از مرکز رشت در کنار یکدیگر قرار گرفتند. از طرف دیگر، با توجه به جدول ۵ می‌توان دریافت که اکثر این توده‌ها از نظر بیشتر صفات مورد مطالعه دارای حداقل مقدار بودند. به‌عنوان مثال، اکثر این توده‌ها دارای ارتفاع مناسب بوده و از نظر صفت روز تا رسیدگی همگی زودرس بودند. اما از نظر صفات محتوای آمیلوز و قوام ژل دارای کمترین مقدار برای این صفات بودند. با بررسی ژنوتیپ‌ها از نظر عملکرد دانه می‌توان دریافت که توده‌های Kh18، Kh4 و Kh6 و رقم گوهر به‌عنوان توده‌های با عملکرد بالا و توده‌های Kh22، Kh21، Kh3 و Kh14 به‌عنوان توده‌های با عملکرد پایین شناخته شدند. از جهتی، بعد از عملکرد کیفیت دانه به‌عنوان دومین هدف اصلاحی برای بهبود محصول است (Kibria *et al*., 2008). قیمت برنج در بازار مصرف بر اساس کیفیت آن تعیین می‌شود (Virmani, 2012). کیفیت دانه برنج یک خصوصیت پیچیده بوده و شامل کیفیت ظاهری، کیفیت تبدیل و کیفیت پخت و خوراک است. این صفات همیشه در کنار

عملکرد دانه، مورد توجه متخصصین اصلاح نباتات قرار گرفته‌اند. به‌خصوص در ایران که ذائقه ایرانی برنج‌های معطر با طول بلند و عرض دانه کم را ترجیح می‌دهد. کیفیت ظاهری و پخت دانه اهمیت بیشتری دارد و ازاین‌رو به‌نژادگران ایرانی همیشه در کنار افزایش عملکرد دانه و اجزای عملکرد دانه خصوصیات مرتبط با کیفیت دانه را نیز مورد توجه قرار دادند (Tabkhkar *et al*., 2011). با توجه به صفات ظاهری دانه، چهار توده Kh21، Kh22، Kh9 و Kh19 با دارا بودن بیشترین طول و عرض دانه به‌عنوان بهترین توده‌ها انتخاب شدند. میزان آمیلوز برای ارقام مختلف به ۳ دسته طبقه‌بندی می‌شوند. میزان درصد کم آمیلوز مقادیر کمتر از ۲۰٪، میزان متوسط بین ۲۰ تا ۲۵ درصد و میزان بالای آن مقادیر بالای ۲۵٪ است (Kumar and Khush, 1987). مقادیرکم آن در برنج سبب می‌شود برنج پس از پخت چسبنده و لعاب‌دار شده و انبساط حجمی پیدا نکند. درحالی‌که مقدار زیاد آن موجب می‌شود برنج بعد از پخت سفت و خشک شود، بنابراین مهم‌ترین میزان آن حد متوسط است که در این حالت برنج پس از پخت نرم و مرطوب مانده و پس از سردشدن سخت نمی‌شود. قوام ژل عبارت است از حرکت ژل برنج پخته شده در لوله آزمایش که ارقام برنج بر اساس طول ژل در لوله (میلی‌متر) به برنج‌هایی با ژل سخت (کم‌تر از ۴۰)، ژل متوسط (۴۰ تا ۶۰) و برنج‌هایی با ژل نرم (بیش‌تر از ۶۰) طبقه‌بندی می‌شود (Cruz and Khush, 2000). بر این اساس، اکثر توده‌های مورد مطالعه دارای مقادیر متوسط و مناسب محتوای آمیلوز بودند و توده‌های Kh6 و Kh20 با دارا بودن محتوای آمیلوز متوسط به‌عنوان بهترین توده‌ها انتخاب شدند. در بررسی تنوع کیفی و ارتباط آن با صفات مورفولوژیکی در ۳۱۸ لاین برنج با استفاده از تجزیه خوشه‌ای آن‌ها که توسط Koutroubas و همکاران (۲۰۰۴) انجام شد لاین‌های مورد مطالعه در سه گروه قرار گرفتند، به گونه‌ای که با توجه به صفات مورد مطالعه ارقام موجود در هر گروه دارای قرابت نزدیکی بودند.

با توجه به رابطه بین عملکرد دانه و خصوصیات مهم زراعی یافتن شاخص‌های مناسب می‌تواند جهت اعمال گزینش برای بهبود عملکرد دانه نقش بسزایی داشته باشد (Allahgholipour, 1997). عملکرد نهایی شلتوک در محصول برنج با استفاده از اجزای تشکیل‌دهنده عملکرد، نظیر تعداد خوشه در واحد سطح، تعداد دانه در خوشه، وزن هزاردانه و صفات مرتبط دیگر تا حدودی قابل پیش‌بینی است (Siadat *et al*., 2004). ازآنجایی‌که بیشتر پروژه‌های اصلاحی بر بهبود عملکرد متمرکز می‌باشند سعی گردیده تا با استفاده از برآورد همبستگی بین صفات اندازه‌گیری شده و عملکرد، صفاتی که بیشترین تأثیر را بر عملکرد دانه دارند شناسایی و معرفی شوند. برآورد همبستگی صفات، اصلاح‌گر را در گزینش غیرمستقیم برای صفات مهم از طریق صفات کم‌اهمیت که اندازه‌گیری آن‌ها آسان است کمک می‌کند (Bapu and Pandian, 1992).

	GY	PH	NP	PL	GL	GW	TGW	HR	DM	AC	GC	SEL
Kh2	4.37	120	11.3	26.5	7.1	1.7	27.8	64.5	117	19.8	3.8	1.96
Kh9	4.23	120	11	25.8	7.3	2.2	29.3	50	120	21.2	3.9	1.68
Kh5	4.43	118	10.3	29.85	7.1	1.9	28.9	58.1	119	20.5	4	1.65
Kh1	4.61	124	11.6	29.46	6.7	2.2	29.9	53.6	117	21.3	4.8	1.75
Kh7	4.27	120	13	30.8	6.9	1.9	30.4	55.4	120	21.5	4.1	1.64
Kh10	4.44	120	13	29.6	6.9	1.8	29.2	55.3	117	20.9	4	1.66
Kh4	4.78	121	13	29.2	6.9	1.9	27.3	54.2	118	21.1	3.8	1.62
Kh3	4.00	118	11	28.73	7.2	1.9	29.3	52.8	117	20	3.9	1.75
Kh14	4.12	133	12.3	29.7	7.2	1.9	27.2	65.4	117	20.5	4	1.57
Kh12	4.31	126	12.3	27.66	7.1	1.8	30	59.8	119	21.4	4.2	1.65
Kh11	4.54	126	12	24.7	7.1	1.9	29.7	57.1	118	21.9	4.9	1.64
Kh17	4.46	128	12	27	7.2	1.8	25.3	54.7	121	20.8	3.7	1.73
Kh15	4.33	131	12	27.6	7.1	2.3	24.8	59.4	121	21.5	4.2	1.76
Kh19	4.25	130	12.3	29.7	7.1	2	30.1	56.9	122	19.6	3.8	1.65
Kh18	4.80	132	11.6	26.2	7.2	1.9	28.5	56.1	117	21.8	4.5	1.7
Kh8	4.28	131	11.6	29.5	7.2	1.9	29.3	54.2	117	20.6	4.4	1.59
Kh21	4.10	138	14	28	7.6	2.3	26	46	117	18.5	3.8	1.67
Kh22	3.90	129	15	29	7.8	2.1	24	45	116	20	4	1.69
Kh16	4.43	130	14	29	7.1	1.9	26.6	47.4	120	20.8	4.1	1.71
Kh6	4.74	130	14.3	29.26	7.3	1.7	27.2	49.9	122	23.7	3.8	1.65
Kh13	4.22	120	11.6	29.86	7.1	2.1	29.1	43.4	119	19.1	4	1.67
Kh20	5.30	100	14.6	25.36	7.3	1.9	30.5	51.3	132	24.3	6.5	1.55



شکل ۱. دندوگرام تجزیه خوشه‌ای به‌روش UPGMA برای گروه‌بندی توده برنج هاشمی با استفاده از صفات مورد مطالعه. GY: عملکرد دانه؛ PH: ارتفاع بوته؛ NP: تعداد خوشه در بوته؛ PL: طول خوشه؛ GL: طول دانه؛ GW: عرض دانه؛ TGW: وزن هزاردانه؛ HGP: درصد برنج سالم؛ DM: روز تا رسیدگی؛ AC: محتوای آمیلوز؛ GC: قوام ژل؛ SEL: طویل شدن دانه پس از پخت.

Figure 1. Dandrogram of cluster analysis using UPGMA method to group the Hashemi rice landraces based on studied traits. GY: grain yield; PH: plant height; NP: number of panicles; PL: panicle length; GL: grain length; GW: grain width; TGW: 1000 grain weight; HGP: healthy grain percentage; DM: number of days to maturity; AC: amylose content; GC: gel consistency; SEL: seed elongation.

جدول ۵. همبستگی صفات مورفولوژیک و کیفیت دانه در توده‌های برنج هاشمی

Table 5. Correlation between morphological and grain quality traits in Hashemi rice landraces

	Grain yield	Plant height	Panicle No.	Panicle length	Grain Length	Grain Width	1000grain weight	Head rice (%)	Days to maturity	Amylose content	Gel Consisteny	Elongation
Grain yield	1											
Plant height	-0.574	1										
Panicle No.	0.5920	0.0540	1									
Panicle length	-0.584	0.195	0.62	1								
Grain Length	-0.314	0.248	0.441	-0.242	1							
Grain Width	-0.316	0.224	-0.012	0.005	0.213	1						
1000-grain Weight	0.689	-0.524	-0.356	-0.01	-0.526	-0.227	1					
Head rice (%)	0.062	0.027	-0.461	-0.112	0.423	-0.392	0.177	1				
Days to maturity	0.633	-0.572	0.539	-0.302	0.037	-0.087	0.226	-0.109	1			
Amylose content	0.781	-0.404	0.583	-0.353	-0.155	-0.336	0.237	0.103	0.636	1		
Gel consistency	0.667	-0.561	0.518	-0.453	-0.054	-0.023	0.411	-0.026	0.631	0.631	1	
Elongation	-0.22	0.081	-0.318	-0.186	-0.096	-0.010	-0.272	0.183	-0.331	-0.323	-0.348	1

بر طبق نتایج به‌دست‌آمده (جدول ۵) تعداد روز تا رسیدن کامل، همبستگی فنوتیپی مثبت و معنی‌داری در سطح احتمال ۱٪ با تعداد پنجه و عملکرد دانه (به‌ترتیب ۰/۵۳۹ و ۰/۶۳۳) داشت. تعداد پنجه با صفات طول خوشه، عملکرد، میزان آمیلوز و قوام ژل همبستگی فنوتیپی معنی‌دار سطح احتمال ۱٪ به ترتیب با مقادیر نشان داد (جدول ۵). بنابرین می‌توان انتظار داشت تعداد پنجه یک صفت مرتبط با عملکرد دانه باشد؛ به‌عبارتی ژنوتیپ‌هایی که از میزان پنجه بیشتری برخوردارند بیشترین عملکرد را دارا باشند (Saif-ur-Rasheed *et al.*, 2002). با افزایش تعداد پنجه، طول خوشه، تعداد دانه پر، وزن هزاردانه و به تبع درصد باروری خوشه نیز

افزایش می‌یابد. همچنین میزان آمیلوز و درجه حرارت ژلاتینه شدن که دو صفت مرتبط با کیفیت دانه می‌باشند نیز افزایش می‌یابد. تعداد پنجه مؤثر همبستگی منفی و معنی‌داری در سطح احتمال ۱٪ با ارتفاع بوته داشت. انتظار میرود که با افزایش ارتفاع بوته، تعداد پنجه مؤثر کاهش یابد و ارقامی که ارتفاع بالایی دارند تعداد پنجه کم‌تر و به‌تبع عملکرد پایین‌تری را دارا باشند. در بررسی Mahdavi و همکاران (۲۰۰۶) نشان داده شد که تعداد پنجه مؤثر با درصد باروری خوشه و ارتفاع دارای همبستگی منفی هستند، هر چند این میزان معنی‌دار نبود که با نتایج حاصل از این بررسی هم‌خوانی نداشت. همچنین Agahi و همکاران (۲۰۱۲) نتایج مشابهی را به‌دست آوردند و گزارش نمودند بین عملکرد دانه با تعداد پنجه همبستگی مثبت و معنی‌دار وجود دارد. برای بررسی صحت گروه‌بندی حاصل از تجزیه کلاستر، از تجزیه تابع تشخیص به‌روش فیشر، استفاده شد. دو تابع تشخیص به‌ترتیب ۸۹ و ۱۱ درصد از واریانس و در مجموع صد درصد تنوع موجود را توجیه کردند. صحت گروه‌بندی حاصل از تجزیه کلاستر نیز ۱۰۰ درصد بود. در این مطالعه از ۲۱ نشانگر ریزماهواره برای بررسی تنوع مولکلولی افراد نیز استفاده گردید. به‌منظور ارزیابی سودمندی نشانگرهای مورد استفاده، از معیارهایی مانند تعداد آلل مشاهده‌شده، تعداد آلل مؤثر، میزان هتروزیگوسیتی، شاخص PIC و شاخص تنوع نی و شانون (Nei and Shannon index) برای کلیه‌ی ژنوتیپ‌ها استفاده شد. سودمندی یک نشانگر به تعداد و فراوانی آلل‌ها بستگی دارد. برای ارزیابی سودمندی نشانگرها شاخص‌ها و معیارها مختلفی ارائه شده است که از مهم‌ترین آن‌ها تعداد آلل‌های مشاهده شده و مؤثر می‌باشند (Hartl and A.G., 2007). در مجموع، نشانگرهای مورد مطالعه ۹۶ آلل تشکیل دادند که تمام آن‌ها چندشکل بودند. از بین نشانگرهای مورد استفاده، نشانگرهای RM19 و RM1109 با ۶ نوار بیشترین و نشانگر RM249 با ۳ نوار کمترین تعداد نوار چندشکل را ایجاد نمودند.

میزان اطلاعات چندشکل (PIC) معادل تنوع ژنتیکی بوده و قدرت تفکیک یک نشانگر را، به واسطه تعداد آلل‌های چند شکل و فراوانی نسبی این آلل‌ها در جمعیت تحت مطالعه، نشان می‌دهد (Senior *et al*., 1998). در این آزمایش میزان اطلاعات چندشکل از یک مکان ژنی به مکان دیگر متفاوت و برای همه نشانگرهای ریزماهواره مورد بررسی یکسان نبود. مقدار بالای این معیار (PIC)، دلالت بر چندشکلی بالا و وجود آلل یا آلل‌های نادر در یک جایگاه نشانگری است و بیانگر قدرت تفکیک و تمایز بالای آن نشانگر می‌باشد (Ribeiro-Carvalho *et al*., 2004). محتوای اطلاعات چندشکلی نشانگرها (PIC) در محدوده بین ۰/۴۹ تا ۰/۸۱ قرار داشت. نشانگرهای RM234 و RM474 به‌ترتیب با مقدار ۰/۸۱ و ۰/۷۹ بالاترین میزان اطلاعات چندشکل را داشتند که بیانگر کارایی بالاتر این دو نشانگر در تمایز ژنوتیپ‌های مورد استفاده در این تحقیق می‌باشد. کم‌ترین مقدار PIC نیز مربوط به نشانگر RM249 با ۰/۴۹ بود و در نتیجه می‌توان گفت این نشانگر از کارایی کم‌تری برای تمایز ژنوتیپ‌ها در این مطالعه برخوردار بود. نشانگرهایی که بالاترین تعداد آلل‌های مشاهده‌شده را نشان دادند دارای PIC بالاتری نیز بودند به‌طوری‌که نشانگر RM234 با ۵ آلل بیش‌ترین میزان PIC را نیز داشت. در مطالعات مختلف در زمینه استفاده از نشانگرهای ریزماهواره در برنج، نتایج مختلفی در این ارتباط به‌دست آمده است، بطوری که در یک مطالعه، از ۳ تا ۱۵ آلل (با متوسط آلل ۷/۹ عدد به‌ازای هر نشانگر) با متوسط PIC ۰/۵۷ (Shishido *et al*., 2006) و در مطالعه‌ای دیگر متوسط ۳/۱۳ آلل برای ۱۵ نشانگر ریزماهواره و محتوای اطلاعات چندشکلی حداقل ۰/۰۷ تا ۰/۷۷ (Singh *et al*., 2002) گزارش شده است. کلیه نشانگرهای استفاده شده در این تحقیق چندشکلی نشان دادند. درصد چندشکلی مشاهده‌شده در این

بررسی برای همه نشانگرها ۱۰۰ درصد به‌دست آمد. درصد چندشکلی مشاهده‌شده با توجه به مکآن‌های چند شکل در محدوده ۸۶ تا ۱۰۰ درصد و با میانگین ۹۶/۳۸ درصد توسط Mahjoob و همکاران (۲۰۱۴) گزارش شد که در مقایسه با تحقیق حاضر مقادیر کم‌تری را نشان داد، این بدان معناست که مکآن‌های چندشکل مشاهده شده در بررسی حاضر بیش‌تر بوده و میزان چندشکلی بالاتر است. در تحقیقات انجام‌شده توسط Ntuli و همکاران (۲۰۱۵) جهت بررسی تنوع ژنتیکی با استفاده از نشانگرهای رپید و ریزماهواره، میزان درصد چندشکلی در محدوده ۸۲ تا ۱۰۰ درصد و با میانگین ۹۴ درصد گزارش شد که پایین‌تر از درصد چندشکلی مشاهده‌شده در آزمایش حاضر بود. Allahgholipour و همکاران (۲۰۱۴) با استفاده از ۵۲ جفت آغازگر ریزماهواره پیوسته با ژن‌های کنترل‌کننده خصوصیات مهم زراعی و فیزیکوشیمیایی دانه برنج، با توزیع نسبتاً یکنواخت روی ۱۲ جفت کروموزوم برنج، درصد چندشکلی مشاهده‌شده را در محدوده ۵۸/۵ تا ۹۲/۲ درصد گزارش کردند که در مقایسه با نتایج به‌دست آمده از درصد چندشکلی آزمایش حاضر مقادیر پایین‌تری را نشان داد. تعداد آلل مؤثر بیانگر تنوع ژنتیکی جمعیت است و برای مقایسه جمعیت‌ها بکار می‌رود. هر چه میزان آلل مؤثر نشانگری بیش‌تر باشد قدرت تفکیک و گروه‌بندی آن نشانگر نیز بیش‌تر خواهد بود. در این بررسی تعداد آلل مؤثر در فاصله ۲/۲۵ تا ۵/۶۵ آلل محاسبه شد، به‌طوری‌که بیش‌ترین میزان این شاخص مربوط به نشانگر RM413 با تعداد ۵/۶۵ آلل مؤثر و کم‌ترین آن مربوط به نشانگر RM249 با ۲/۲۵ آلل مؤثر به‌دست آمد. میانگین این شاخص نیز معادل ۳/۹۷ آلل به‌ازای هر نشانگر محاسبه شد. هرچه میزان این شاخص بالاتر باشد، بیانگر مؤثر و کارا بودن نشانگر است. در بررسی Tabkhkar و همکاران (۲۰۱۱) میزان آلل مؤثر در محدوده ۲/۶۸ تا ۵/۲۵ با میانگین ۳/۷۴ آلل مؤثر گزارش شد. همچنین میزان آلل مؤثر برای نشانگر RM204، توسط Sundaram و همکاران (۲۰۰۸)، ۲/۶۳ گزارش شد که میزان محاسبه شده بررسی حاضر بیش‌تر بود. تفاوت در تعداد آلل‌ها در مکآن‌های ژنی مختلف به‌علت تفاوت در ژنوتیپ‌ها و مواد گیاهی مورد استفاده در پژوهش‌های مختلف می‌باشد. با توجه به این‌که آغازگرهای طراحی‌شده برای جایگاه‌های مختلف ریزماهواره به‌صورت کاملاً اختصاصی عمل کرده و فقط جایگاه هدف را تکثیر می‌نمایند، بنابراین این تفاوت احتمالاً به‌علت تغییر در طول واحد تکراری در اثر وقوع جهش در منابع ژنتیکی مختلف است که با توجه به وجود نرخ جهش بالا در جایگاه‌های ریزماهواره و تنوع بسیار زیاد ارقام مورد مطالعه، باعث تفاوت در نتایج حاصل شده است. در بررسی انجام شده توسط Allahgholipour و همکاران (۲۰۱۴) با استفاده از ۵۲ جفت آغازگر ریزماهواره پیوسته با ژن‌های کنترل‌کننده خصوصیات مهم زراعی و فیزیکوشیمیایی دانه برنج، در ۹۴ ژنوتیپ مختلف برنج، تعداد آلل مؤثر را بین ۹/۱۵-۱/۶۸ با میانگین ۴/۷۵ آلل مؤثر گزارش کردند. همچنین تعداد آلل‌های مؤثر در محدوده ۲-۸/۸ و با میانگین ۵/۲۳ توسط Hajmansoor و همکاران (۲۰۱۰) گزارش شد که با نتایج تحقیق حاضر تا حدودی در یک راستا بود. میزان آلل مؤثر در محدوده ۱/۶ تا ۶/۶۴ و با میانگین ۲/۸ به‌ازای هر نشانگر توسط Sohrabi و همکاران (۲۰۱۳) گزارش شد. میزان هتروزیگوسیتی مورد انتظار میزان پراکندگی یا فاصله ژنتیکی و قرابت و تشابه ژنتیکی را در بین گروه‌ها مشخص می‌کند. هرچه میزان هتروزیگوسیتی نشانگری بیش‌تر باشد، توانایی بیش‌تر نشانگر را نشان می‌دهد و پراکندگی بیش‌تری در بین افراد یک گروه وجود دارد. در این بررسی میزان هتروزیگوسیتی مورد انتظار در محدوده ۰/۰۳ تا ۱ متغیر بود. کم‌ترین آن مربوط به نشانگرهای RM234 و

بیش‌ترین آن مربوط به نشانگرهای RM402 و RM279 بود. میانگین این شاخص نیز برای هر نشانگر ۰/۴۴ محاسبه شد. این مقادیر نشان می‌دهد که نشانگرهای RM402 و RM279 بیش‌ترین پراکندگی را در بین جمیت نشان می‌دهند. Da silva و همکاران (۲۰۱۵) تنوع ژنتیکی تحمل به شوری را با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره، ارزیابی و میزان هتروزیگوسیتی مورد انتظار را در محدوده ۰/۰۵ تا ۰/۵۰ با میانگین ۰/۳۶ گزارش کردند. جهت بررسی تنوع ژنتیکی عطر برنج توسط نشانگرهای مولکولی ریزماهواره و رپید با استفاده از ۳ نشانگر ریزماهواره در ۱۵ ژنوتیپ برنج میزان هتروزیگوسیتی مورد انتظار در محدوده ۰/۴۵ تا ۰/۶۲ و با میانگین ۰/۵۵ توسط Kibria و همکاران (۲۰۰۹) گزارش شد که در مقایسه با نتایج آزمایش حاضر مقادیر بالاتری را نشان داد. میزان هتروزیگوسیتی مشاهده شده در مطالعه حاضر در محدوده ۰/۰۳ تا ۱/۰۰ به‌دست آمد که کم‌ترین آن مربوط به نشانگرهای RM234 و RM1141 و بیش‌ترین آن مربوط به نشانگرهای RM279 و RM402 بود. میانگین میزان هتروزیگوسیتی مشاهده شده در این بررسی ۰/۳۵ به‌ازای هر نشانگر برآورد شد. یکی از مهم‌ترین شاخص‌ها برای ارزیابی تنوع ژنی در بین ارقام و جمعیت‌ها، شاخص تنوع ژنی Nei (۱۹۷۳) می‌باشد. تنوع ژنی احتمال تفاوت آلل تصادفی بین دو فرد را نشان می‌دهد. هرچه میزان هتروزیگوسیتی یک گروه بیش‌تر باشد میزان تنوع ژنی بیش‌تری نیز دارند. در این بررسی میزان این شاخص، در محدوده ۰/۵۸ تا ۰/۸۱ محاسبه شد که کم‌ترین آن مربوط به نشانگر RM249 با میزان تنوع ۰/۵۸ و بیش‌ترین آن مربوط به نشانگر RM474 با میزان تنوع ۰/۸۱ برآورد شد. میانگین تنوع ژنی ۰/۷۴ به‌ازای هر نشانگر به‌دست آمد. میانگین تنوع ژنی در بین ارقام برنج کوبا، توسط Alvarezv و همکاران (۲۰۰۷) در حدود ۰/۷ گزارش شد که تقریباً با میانگین میزان تنوع ژنی محاسبه شده در تحقیق حاضر (۰/۷۴) در یک راستا می‌باشد. همچنین Tabkhkar و همکاران (۲۰۱۲) تنوع ژنتیکی ارقام برنج را با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره پیوسته با صفات پخت، ارزیابی و میزان تنوع ژنی را در محدوده ۰/۶۳ تا ۰/۸۱ با میانگین ۰/۷۲ گزارش کردند که با تحقیق حاضر (۰/۷۴) در یک راستا بود. در تحقیق دیگری از Tabkhkar و همکاران (۲۰۱۱) جهت بررسی پتانسیل نشانگرهای ریزماهواره پیوسته با عطر دانه در ارقام برنج، میزان تنوع ژنی در فاصله ۰/۴۲ تا ۰/۶۴ گزارش کردند. شاخص شانون، یکی دیگر از شاخص‌های تنوع می‌باشد. میانگین شاخص شانون در بین توده‌های مطالعه‌شده، از نظر هر نشانگر ریزماهواره، برآورد شد. در مطالعه ما شاخص شانون در فاصله ۰/۹۳ تا ۱/۸۷ برآورد شد که کم‌ترین آن مربوط به نشانگر RM249 و بیش‌ترین آن مربوط به نشانگرهای RM234 و RM474 بود. میانگین شاخص شانون ۱/۴۹ به‌ازای هر نشانگر برآورد شد. در تحقیقات انجام‌شده توسط Motlagh و همکاران (۲۰۱۵) میزان شاخص شانون در محدوده ۰/۸۲ تا ۱/۳۸ با میانگین ۱/۰۵ گزارش شد که با اندکی تفاوت نتایج تقریباً مشابهی را با مطالعه حاضر داشت. Bajracharya و همکاران (۲۰۰۶) تنوع ارقام بومی برنج نپال را، ارزیابی و مقدار شاخص شانون را از ۰/۰۴ تا ۰/۸ با میانگین ۰/۲۳ گزارش کردند. نتایج آن‌ها از نتایج به‌دست‌آمده از آزمایش حاضر پایین‌تر بود که دلیل این اختلاف می‌تواند به‌خاطر مواد آزمایشی و همچنین نشانگرهای مورد مطالعه باشد. علاوه بر این موارد نباید از تأثیر اثرات محیطی بر نتایج غافل شد. مطمئناً محیط‌های کشت و مواد آزمایشگاهی نیز می‌تواند بر نتایج به‌دست‌آمده تأثیرگذار باشد. همچنین مسئله تکامل ارقام نیز بی‌تأثیر نمی‌باشد. به‌طورکلی نشانگرهایی که دارای واحدهای تکراری دو نوکلئوتیدی GA و با تکرارهای زیاد دارند، تنوع ژنی و تعداد آلل‌های بالاتری را در مقایسه با سایر نشانگرهای ریزماهواره نشان

می‌دهند این نتیجه توسط Ghneim Herrera و همکاران (۲۰۰۸) گزارش شد. آن‌ها با برآورد همبستگی بین تعداد آلل‌ها و تنوع ژنی نشان دادند که تعداد تکرارها در نشانگرهای ریزماهواره، به تنوع ژنی و تکرار آلل‌ها بستگی دارد به‌طوری‌که مکان‌های دارای موتیف‌های تکراری دو واحدی، چندشکل‌تر از مکان‌های سه نوکلئوتیدی یا چهار نوکلئوتیدی عوامل تأثیرگذار بر تنوع ریزماهواره‌ها مطرح شده است.

به‌طورکلی بالا بودن میانگین‌های تعداد آلل مؤثر، شاخص تنوع ژنی نی، شانون و میزان اطلاعات چندشکل در جایگاه‌های ریزماهواره بیانگر کارآمدی ریزماهواره‌های مورد استفاده برای تمایز ژنتیکی ژنوتیپ‌های مورد مطالعه می‌باشند. ازآنجایی‌که میانگین تعداد آلل هر نشانگر ریزماهواره، مناسب بودن آن مکان ژنی را برای تخمین تنوع ژنتیکی نشان می‌دهد و نشان‌دهنده این است که آلل‌ها توزیع یکنواختی در بین ارقام مورد بررسی داشته‌اند، بنابراین نشانگرهای RM413 و RM474 با دارا بودن بیشترین میزان تعداد آلل مؤثر، شاخص تنوع ژنی نی و میزان اطلاعات چندشکل در این مطالعه به عنوان بهترین نشانگر جهت تجزیه تنوع ژنتیکی در ژنوتیپ‌های مورد مطالعه شناسایی شدند (جدول ۶). در حقیقت این نشانگرها با داشتن آماره‌های تنوع ژنتیکی بالاتر از قدرت بیشتری در تفکیک ژنوتیپ‌ها برخوردارند و از آن‌ها می‌توان در تمیز دادن ژنوتیپ‌ها از هم بهره بیشتری جست. با استفاده از تجزیه خوشه‌ای توسط نرم‌افزار R گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها صورت گرفت. تجزیه خوشه‌ای با استفاده از ضرایب تشابه تطابق ساده، جاکارد، دایس و با روش‌های نزدیک‌ترین همسایه‌ها و دورترین همسایه‌ها و UPGMA انجام شد. در این بررسی بیش‌ترین ضریب کوفنتیک، مربوط به ضریب تشابه جاکارد بود و در نتیجه فقط نتایج این روش ارائه شد. برای برآورد تشابه ژنتیکی بین ارقام و تعیین تعداد کلاستر، از ضرایب مختلف استفاده شد و در نهایت ازآنجایی‌که دندروگرام حاصل از روش UPGMA با ضریب تشابه جاکارد بالاترین ضریب همبستگی کوفنتیک را داشت، این دندروگرام برای تفسیر انتخاب شد. ضریب همبستگی بین ماتریس تشابه حاصل از ضریب تشابه جاکارد با ماتریس خروجی حاصل از دندروگرام تجزیه خوشه‌ای، ۸۰ درصد بود و نشان داد که روش تجزیه خوشه‌ای مورد استفاده نسبت به سایر روش‌ها، به خوبی توانسته است اطلاعات حاصل از نشانگرها را برای تفکیک توده‌های برنج مورد استفاده قرار دهد. چنانچه دندروگرام تجزیه خوشه‌ای با ضریب تشابه جاکارد و روش UPGMA نشان می‌دهد (شکل ۲) با قطع دندروگرام ژنوتیپ‌ها در ۴ گروه تقسیم شدند.

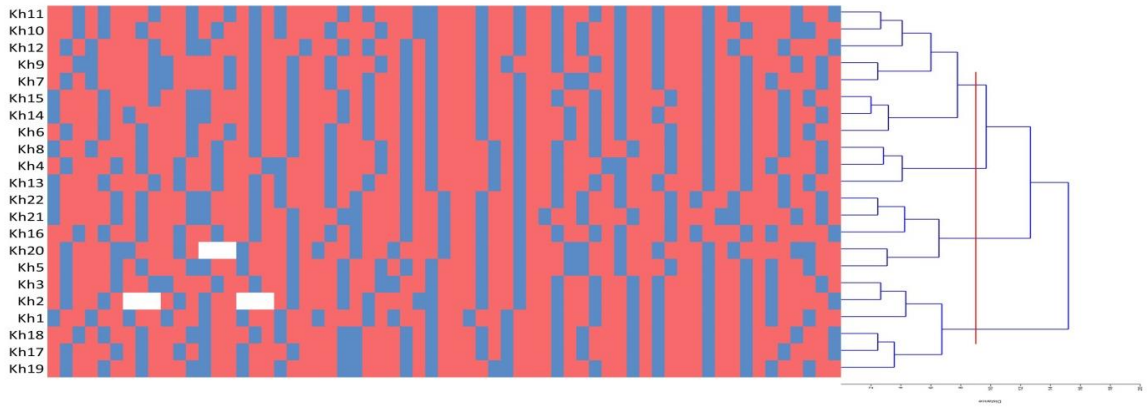
جدول ۶. تجزیه آماری تعداد آلل‌های مشاهده‌شده و مؤثر، هتروزیگوسیتی مورد انتظار، محتوای اطلاعات چندشکلی، شاخص شانون و شاخص تنوع ژنی نی برای نشانگرهای ریز ماهواره مورد مطالعه

Table 6. Number of observed alleles, number of effective alleles, expected heterozygosis, PIC, Shannon’s information index and Nei’s gene diversity index for the studied SSR markers

Primer	Na	Ne	Nei	I	Ho	He	PIC
RM331	5	4.65	0.75	1.68	0.37	0.41	0.71
RM111	5	3.21	0.63	1.25	0.06	0.2	0.57
RM231	4	3.45	0.71	1.29	0.06	0.23	0.66
RM19	6	4.32	0.72	1/58	0.28	0.28	0.67
RM234	5	4.65	0.83	1.98	0.03	0.52	0.81
RM241	5	4.21	0.74	1.46	0.04	0.27	0.70
RM249	3	2.25	0.58	0.93	0.06	0.22	0.49
RM402	4	3.41	0.81	1.68	0.71	0.72	0.78

RM413	5	5.65	0.80	1.73	0.53	0.53	0.77
RM279	4	3.75	0.74	1.29	1	1	0.69
RM5055	5	4.41	0.75	1.46	0.34	0.34	0.70
RM6643	4	3.66	0.69	1.29	0.56	0.56	0.63
RM1109	6	5.21	0.77	1.57	0.37	0.38	0.74
RM1141	5	4.7	0.77	1.58	0.03	0.03	0.73
RM1024	4	4.34	0.74	1.39	0.50	0.50	0.69
RM3337	4	3.31	0.73	1.38	0.29	0.31	0.68
RM215	4	3.66	0.69	1.29	0.56	0.56	0.63
RM441	5	4.59	0.73	1.62	0.39	0.44	0.72
RM510	4	3.39	0.77	1.66	0.69	0.74	0.75
RM474	5	4.33	0.81	1.87	0.13	0.49	0.79
RM219	4	3.22	0.69	1.28	0.36	0.50	0.63
Mean	4.57	3.97	0.74	1.49	0.35	0.44	0.69

PIC: محتوای اطلاعات چندشکلی، He: میزان هتروزیگوسیتی مورد انتظار، Ho: میزان هتروزیگوسیتی مشاهده‌شده، I: شاخص تنوع شانون، Nei: شاخص تنوع ژنی نی، Ne: تعداد آلل مؤثر، Na: تعداد آلل مشاهده‌شده، Primer: نشانگر



شکل ۲. دندروگرام تجزیه خوشه‌ای به روش UPGMA برای گروه‌بندی توده برنج هاشمی با استفاده از ۲۱ نشانگر ریزماهواره
Figure 2. Dandrogram of cluster analysis using UPGMA method to group the Hashemi rice landraces based on 21 SSR markers

نخستین گروه، شامل شش ژنوتیپ بود (kh17، Kh18، Kh1، Kh2 و Kh3 و رقم شاهد هاشمی مؤسسه تحقیقات برنج کشور). توده‌های مزبور از مناطق سیاه‌مزگی، کماچال، پنجاه، بلسنبه، کته‌سر و شقاجی بودند. نکته جالب‌توجه این‌که توده‌های ۲ و ۳ از آستانه در این گروه قرار گرفتند. گروه دوم شامل ۵ توده بودند (Kh5، Kh16، Kh21 و Kh22 و رقم استاندارد گوهر). توده‌های مذکور به‌ترتیب از مناطق ورازکاه، گیله‌پروسر، جیرده، ناصرکیاده و مریدان بودند. دو توده ۵ و ۲۰ از ناحیه سنگر نیز در این گروه نیز در کنار یکدیگر قرار گرفتند. در گروه سوم سه توده قرار داشتند (Kh13، Kh4 و Kh8). نکته جالب توجه اینکه دو توده ۱۳ و ۸ از صومعه‌سرا نیز در این گروه کنار هم قرار گرفته بودند. در گروه آخر نیز ۸ توده قرار گرفتند (Kh9، Kh10، Kh11، Kh12، Kh7، Kh14، Kh15 و Kh6). این توده‌ها به ترتیب از مناطق آتشگاه، بیجارپس، جمعه‌بازار، سیاه‌درویشان، اسپند، کوچکام، سربندان و بازقلعه قرار داشتند. نکته جالب‌توجه این‌که دو توده ۹ و ۱۰ از مرکز رشت، ۱۰ و ۱۱ از صومعه‌سرا و ۶ و ۱۵ از سنگر در این گروه کنار یکدیگر قرار گرفتند.

نتیجه‌گیری

به‌طورکلی با توجه به شاخص‌های اندازه‌گیری‌شده نشانگرهای RM413 و RM474 برای تفکیک ژنوتیپ‌ها مناسب‌ترین نشانگرها شناخته شدند. در

مجموع نتایج به‌دست‌آمده در این تحقیق مبین وجود تنوع ژنتیکی در توده‌های برنج هاشمی مورد مطالعه می‌باشد. از جهتی، نتایج حاصل از نشانگرهای ریزماهواره مورد استفاده در این تحقیق نشان داد که برنج هاشمی در واقع یک توده بسیار متنوع است که از نظر مولکولی تنوع زیادی دارد. آنچه به نام برنج هاشمی در مناطق وسیعی از شالیزارهای استان گیلان کشت می‌شود، در واقع یک یا چند توده برنج محلی است که تنوع ژنتیکی زیادی دارد و علی‌رغم شباهت‌های مرفولوژیک نسبی بین آن‌ها، دارای تفاوت‌های ژنتیکی زیادی است. از طرفی تفاوت منطقه مورد کشت دلیل بر تفاوت بین ژنوتیپ‌ها نیست و تفاوت‌ها و شباهت‌ها تا حدی مستقل از محیط نیز قابل دسته‌بندی هستند. وجود تنوع ژنتیکی در توده محلی برنج هاشمی، امکان خالص‌سازی و گزینش لاین‌های برتر، حفظ و استفاده از ژنوتیپ‌های مختلف را در برنامه‌های اصلاحی فراهم می‌کند.

سپاسگزاری

از مسئولین و کارکنان محترم مؤسسه تحقیقات برنج کشور به‌خاطر مساعدت‌های لازم، تقدیر و تشکر می‌گردد.

REFERENCES

Agahi K, Fotokian MH, Younesi Z (2012) Study of genetic diversity and important correlations of agronomic traits in rice genotypes (*Oryza sativa* L.). Iranian Journal of Biology. 25: 97-109.

Akbarpour M, Khavari-Nejad RA, Moumeni A, Najafi F (2016) Molecular and physiological performance in response to drought stress in Iranian rice cultivars. Russian Journal of Plant Physiology. 63(1): 158-165.

Allahgholipour M, Farshadfar E, Rabiei B (2014) Evaluation of molecular diversity in rice (*Oryzas sativa* L.) genotypes using microsatellite markers linked with agronomic and grain physicochemical characteristics. Iranian Journa of Crop Sciences. 15: 337-354. (In Persian)

Allahgholipour M (1997) Correlation of some important crop characteristics of rice with yield through causality analysis. Master's thesis, Faculty of Agriculture, University of Guilan.

Alvarez A, Fuentes J.L, Puldon V, Gomez P.J, Mora L, Duque M.C, Gallego G, Tohme J.M (2007) Genetic diversity analysis of Cuban traditional rice (*Oryza sativa* L.) varieties based on microsatellite marker. Genetic and Molecular Biology. 30 (4): 1109-1117.

Bajracharya J, Steele K, Jarvis D, Sthapit B, Witcombe J (2006) Rice landrace diversity in Nepal: variability of agro-morphological traits and SSR markers in landraces from a high-altitude site. Field Crops Research. 95(2-3): 327-335.

Bapu J, Pandian GS (1992) Genotypic association and path analysis in F_3 generation of rice crosses. The Madras Agricultural Journal. 11: 619-623.

Bandumula N (2018) Rice Production in Asia: Key to Global Food Security. Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences. 88: 1323-1328 .

Cagampang GB, Perez CM, Juliano BO (1973) A gel consistency test for eating quality of rice. Journal of the Science of Food and Agriculture. 24(12): 1589-1594.

Chakravarthi BK, Naravaneni R (2006)SSR marker based DNA fingerprinting and diversity study in rice (*Oryza sativa* L.). African Journal of Biotechnology. 5: 684-688.

Cruz ND, Khush G (2000) Rice grain quality evaluation procedures.

Aromatic Rices. 3: 15-28.

Chamani Mohasses F, Samiyazadeh H, Rabiei B, SoHani M.M, Ghorbani H.R (2012) Investigation of heterotrophic rice lines using SSR markers and their relation with the presentation of hybrids. Special Issue of the 12th Iranian Congress of Genetics. 1-15.

Da Silva T.A, Cantagalli L.B, Saavedra J, Lopes D (2015) Population structure and genetic diversity of Brazilian popcorn germplasm inferred by microsatellite markers. Electronic Journal of Biotechnology. 18:181-187.

Fathi Q (1998) Growth and nutrition of crops. Publications University of Mashhad. (In Persian)

Ghneim Herrera T, Posso Duque D, Pérez Almeida I, Torrealba Núñez G, Pieters AJ, Martinez CP, Tohme JM (2008) Assessment of genetic diversity in Venezuelan rice cultivars using simple sequence repeats markers. Electronic Journal of Biotechnology. 11(5): 3-4.

Hajmansour S, Bihamta M, Nabipour A, Mohammadi A, Pirseyedi M, Nikkhah H (2010) Genetic Diversity in Barley Genotypes: II. Microsatellite Markers and Morphological Traits. Seed and Plant Improvment Journal. 26(2): 150-172.

Hartl D.L, Clarke A.G (2007) Principles of Population Genetics, Fourth Edition. Sinauer Associates, Inc. Publishers.

Juliano B (1971) A simplified assay for milled rice amylose. Cereal Science Today. 16: 334-360.

Kennedy G, Burlingame B (2003) Analysis of food composition data on rice from a plant genetic resources perpective. Food Chemistry. 80 (4): 589-596.

Kibria K, Islam M, Begum S (2008) Screening of aromatic rice lines by phenotypic and molecular markers. Bangladesh Journal of Botany. 37(2): 141-147.

Kibria K, Nur F, BegumIslam S.N, Paul M.M, Rahman S.K, Azam S. M.M (2009) Molecular marker based genetic diversity analysis in aromatic rice genotypes using SSR and RAPD markers. Journal of Sustainable Crop Production. 4(1): 23-34.

Kordrostami M, Rabiei B, Kumleh HH (2016) Association analysis, genetic diversity and haplotyping of rice plants under salt stress using SSR markers linked to SalTol and morpho-physiological characteristics. Plant Systematics and Evolution. 302(7): 871-890.

Koutroubasa S.D, Mazzinib F (2004) Grain quality variation and relationships with morpho-physiological traits in rice (*Oryza sativa* L.) genetic resources in Europe. Field Crops Research. 86 (2): 115- 130.

Kumar I, Khush GS (1987) Genetic analysis of different amylase Levels in rice. Crop Science. 27: 1167-1172.

Luh BS (2013) *Rice: Volume I. Production*. Springer Science & Business Media.

Mahdavi F, Ismaili MA, Fallah A, Pyrodashti H (2006) Study of morphological characteristics, physiological indices, grain yield and its components in rice (*Oryza sativa* L.) landraces and improved cultivars. 7 (4): 280-297.

Mahdavi F, Ismaili M.A, Fallah A, Pyrodashti H (2006) Study of morphological characteristics, physiological indices, grain yield and its components in rice (*Oryza sativa* L.) landraces and improved cultivars. 7 (4): 280-297

Mahjoob B, Najafi-Zarini H, Hashemi S.H.R (2014) Assessment of Genetic Relationships Among 36 Brassica Genotypes using ISSR Molecular Markers. Journal of Crop Breeding. 6(14): 96-106

McCouch SR, Teytelman L, Xu Y, Lobos KB Clare K, Walton M, Fu B,

Maghirang R, Li Z, Xing Y (2002) Development and mapping of 2240 new SSR markers for rice (*Oryza sativa* L.). DNA Research. 9(6): 199-207.

Ming H, Fang-ming X, Li-yan C.H, Xiang-qian Z.H, Jojee L, Madonna D (2010) Comparative analysis of genetic and structure in rice using ILP and SSR markers. Rice Sience. 17 (4): 257-268.

Motlagh MRS, Hbibi F, Ebadi AA (2015) Genetic diversity of Pyricularia grisea, the causal agent of rice blast by SRR. Acta Scientiarum Polonorum Hortorum Cultus. 14(1): 15-28.

Murray MG, Thompson WF (1980) Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. Nucleic Acids Research. 8(19): 4321-4326.

Nei M (1973) Analysis of gene diversity in subdivided populations. Proceedings of the National Academy of Sciences. 70(12): 3321-3323.

Ntuli NR, Tongoona PB, Zobolo AM (2015) Genetic diversity in *Cucurbita pepo* landraces revealed by RAPD and SSR markers. Scientia Horticulturae. 189: 192-200.

Phetmanyseng X, Xie A, Hernandez J.E, Boirromeom T.H (2010) Hybrid rice heterosis and genetic diversity of IRRI and Lao rice. Field Crops Research. 117: 18-23.

Ribeiro-Carvalho C, Guedes-Pinto H, Igrejas G, Stephenson P, Schwarzacher T, Heslop-Harrison J (2004) High levels of genetic diversity throughout the range of the Portuguese wheat landrace ‘Barbela’. Annals of Botany. 94(5): 699-705.

Senior M, Murphy J, Goodman M, Stuber C (1998) Utility of SSRs for determining genetic similarities an relationships in maize using an agarose gel system. Crop Science. 38(4): 1088-1098.

Saif-ur-Rasheed M, Sadaqat HA, Babar M (2002) Cause and Effect Relations of Panicle Traits in Rice (*Oryza sativa* L.). Asian Journal of Plant Sciences. 1(2): 123-125.

Shishido R, Kikuchi M, Nomura K, Ikehashi H (2006) Evaluation of genetic diversity of wild rice (*Oryza rufipogon* Griff.) in Myanmar using simple sequence repeats (SSRs). Genetic Resources and Crop Evolution. 53(1): 179-186.

Siadat SA, Fathi AH, Etminan SBM (2004) Effect of planting date on yield and yield components of 3 rice varieties. Iranian Journal of Agricultural Science. 35(1): 227-234.

Singh S, Vijaykumar C, Xu W, Bagali P, Sarkarung S, Singh R, Singh O, Singh V, LI Z (2002) Microsatellite assay of rainfed lowland genotypes. Rice Genetics Newsletter. 19: 15-17.

Sohrabi M, Rafii Y, Hanafi M, Abdul Latif M.d (2013) Genetic divergence of Malaysian upland rices revealed by microsatellite marker POJ 6(3): 175-182 ISSN: 1836-3644.

Sundaram R.M, Naveenkumar B, Birdar S.K, Balachandran S.M, Mishra B, IlyasAhmed M, Viraktamath B.C, Ramesha M.S, Sarma N.P (2008) Identification of informative SSR markers capable of distinguishing hybrid rice parental lines and their utilization in seed purity assessment. Euphytica. 163(2): 215-224.

Tabkhkar N, Rabiei B, Sabouri A (2012) Genetic diversity of rice cultivars by microsatellite markers tightly linked to cooking and eating quality. Australian J. Crop Sci. 6(6): 980-985.

Tarang A, Gashti AB (2016) The power of microsatellite markers and AFLPs in revealing the genetic diversity of Hashemi aromatic rice from Iran. Journal of Integrative Agriculture. 15: 1186-1197.

Tarang A, Hosseini M (2017) Evaluation of molecular diversity of different

Hashemi rice varieties of north of Iran using microsatellite markers. Cereal Research, 7(1): 17-31.

Virmani SS (2012) Heterosis and hybrid rice breeding, Springer Science & Business Media.

Xu Y (2010) Molecular plant breeding, CABI Publishing.

Verma K, Kumar A.G (2017) Studies of Genetic Diversity in the Natural Population of *Cassia Fistula* L. using RAPD and ISSR Markers (Doctoral dissertation).

Zhou J, You A, zhu L, He G (2012) Association analysis of important agronomictraits in Japonica rice germplasm. African Journal of Biotechnology. 12: 2956-2970.