

دانشگاه گیلان
دانشکده علوم کشاورزی

تحقیقات غلات

دوره پنجم / شماره دوم / تابستان ۱۳۹۴ (۱۰۷-۱۱۹)

بررسی تنوع آلی و هاپلوتایپی نشانگرهای ریزماهواره پیوسته به QTL بزرگ اثر کنترل کننده تحمل به خشکی در کروموزوم شماره نه برنج

رقیه تولی^۱، علی اعلمی^۲، حسین صبوری^{۳*} و عاطفه صبوری^۲

۱ و ۲- به ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد و استادیار گروه زراعت و اصلاح نباتات دانشکده علوم کشاورزی دانشگاه گیلان،
۳- دانشیار گروه تولیدات گیاهی دانشکده کشاورزی دانشگاه گنبد کاووس

(تاریخ دریافت: ۹۲/۱۱/۲۸ - تاریخ پذیرش: ۹۳/۸/۵)

چکیده

به منظور بررسی تنوع آلی و هاپلوتایپی و شناسایی نشانگرهای آگاهی بخش خصوصیات ریشه تعدادی از ژنوتیپ‌های برنج تحت شرایط تنش خشکی، از هفده نشانگر ریزماهواره کروموزوم شماره نه برنج که با QTL بزرگ اثر کنترل کننده مرفولوژی ریشه در شرایط تنش خشکی پیوسته بودند، استفاده شد. بر اساس داده‌های ژنتیکی، تعداد ۲۲ ژنوتیپ مورد مطالعه در دو گروه طبقه‌بندی شدند. در گروه اول که شامل ژنوتیپ Bala نیز بود، ژنوتیپ‌های متحمل‌تر به خشکی قرار گرفتند و گروه دوم، شامل ژنوتیپ‌هایی بود که از لحاظ صفات ریشه ضعیف‌تر و احتمالاً حساس به خشکی بودند. نتایج مولکولی نشان داد که نشانگرهای RM24671 و RM215 واقع در این ناحیه کروموزومی دارای بیشترین تنوع آلی بودند. نتایج تجزیه ارتباط بین نشانگرها و صفات مورد بررسی تحت شرایط تنش نشان داد که نشانگرهای RM530-A با ضخامت ریشه ($B=0.431$)، RM24627-A با وزن ریشه ($B=0.573$)، RM24669-C با تعداد ریشه ($B=0.620$)، RM6535-C با وزن ساقه ($B=-0.503$)، RM684-A با طول ساقه ($B=0.832$)، RM160-A با طول ریشه ($B=0.373$)، RM684-A با کد ژنوتیپی ($B=-0.811$) و RM24627-A با زیست توده ($B=1.073$) دارای بیشترین ضریب رگرسیون استاندارد شده بودند که در صورت تایید نتایج به وسیله آزمایش‌های بیشتر می‌توانند به عنوان نشانگرهای آگاهی بخش مورد استفاده قرار گیرند. تجزیه هاپلوتایپی نیز ۲۲ ژنوتیپ برنج را در قالب ۱۶ هاپلوتایپ مختلف قرار داد و هاپلوتایپ شماره ۸ که شامل ژنوتیپ‌های دیلمانی و IR25571 بود، بیشترین شباهت را به ژنوتیپ Bala داشت. بنابراین، به نظر می‌رسد این ژنوتیپ‌ها همانند والد Bala واجد QTL‌های کنترل کننده تحمل به خشکی در این ناحیه ژنومی باشند. در صورت تایید نتایج، می‌توان از این ژنوتیپ‌ها در برنامه‌های به‌نژادی تحمل به تنش خشکی استفاده کرد.

واژه‌های کلیدی: تجزیه ارتباط، تنش خشکی، نشانگر آگاهی‌بخش، هاپلوتایپ

مقدمه

تحمل به تنش خشکی خصوصیتی بسیار پیچیده است. در شرایط تنش خشکی، کمبود آب میزان عملکرد محصول را به شدت تحت تأثیر قرار می‌دهد (Blum, 1996). طول یا حجم ریشه و قابلیت سبز ماندن در اثر وقوع تنش می‌تواند یکی از ابزارهای ارزیابی تحمل به تنش کمبود آب باشد (Blum, 2011). ارقام برنج متحمل به خشکی و با عملکرد بالا برای محیط‌های با محدودیت آبی مناسب هستند و تولید برنج را بهبود می‌بخشند. از این‌رو، شناسایی ارقام برتر و مناسب تحت شرایط تنش بسیار مهم است (Babu, 2010).

تنوع ژنتیکی، نقش بسیار مهمی در پیشبرد برنامه‌های اصلاحی و حفاظت از منابع ژنتیکی دارد که از طریق صفات مرفولوژیک، بررسی شجره‌ها و نشانگرهای مولکولی میسر می‌شود. از نشانگرهای متفاوتی مانند نشانگرهای مرفولوژیک، بیوشیمیایی و DNA برای بررسی تنوع ژنتیکی گیاهان استفاده می‌شود (Naghavi et al., 2004). تجزیه ارتباط (Association analysis) و مطالعه رابطه بین نشانگرهای مولکولی و صفات زراعی نیز دارای کاربردهای متعددی از جمله امکان بررسی پتانسیل ژنتیکی ژنوتیپ‌های خاص پیش از ارزیابی فنوتیپی، شناسایی آلل‌های صفت مطلوب در مجموعه ژرم‌پلاس، تسهیل مکان‌یابی دقیق QTL‌ها و تأیید ژن‌های کاندیدای مسئول صفات کمی است (Gebhardt et al., 2004).

با بررسی‌های لیو و همکاران (Liu et al., 2010) QTL‌های گوناگونی برای پاسخ به خشکی در برنج شناسایی شدند. این QTL‌ها برای تنظیم اسمزی، پایداری غشای سلولی، دمای کانوپی، میزان اسید آسزیک، وضعیت آب برگ، مرفولوژی ریشه و توانایی نفوذ ریشه در خاک در جمعیت‌های مختلف بودند. از آنجا که ریشه یکی از اندام‌های مهم و تاثیرگذار در تحمل به خشکی است، از این‌رو تحقیقات متعددی در خصوص شناسایی ژن‌ها و QTL‌های کنترل‌کننده ویژگی‌های ریشه در شرایط تنش خشکی صورت گرفته است. در مطالعه‌ای تعداد ده QTL برای حداکثر عمق ریشه روی کروموزوم شماره نه برنج شناسایی شد، اما فقط یک QTL در هر دو شرایط تنش خشکی و بدون تنش مشابه بودند. این مطلب پیچیدگی کنترل تحمل به خشکی را در این صفت نشان می‌دهد. هفت QTL همبسته با ضخامت ریشه تحت

شرایط نرمال و تنش خشکی شناسایی شد که دو عدد از آنها در هر دو شرایط یکسان بودند. همچنین بیشتر از ده QTL برای سایر ویژگی‌های ریشه از قبیل حجم ریشه، وزن خشک ریشه، میزان عمق ریشه و نسبت ریشه به ساقه شناسایی شد که هر یک از آنها در حدود ۴/۳۲ تا ۲۸/۱۸ درصد از تنوع فنوتیپی صفت را توجیه کردند (Yue et al., 2004).

بررسی تنوع هاپلوتایپی ارقام برنج در نواحی مربوط به QTL‌های بزرگ‌اثر می‌تواند اطلاعات ارزشمندی در ارتباط با شناسایی بهترین و موثرترین ترکیب آلی ناحیه QTL مورد نظر برای انتخاب به کمک نشانگر در اختیار محققین قرار دهد. نورتون و همکاران (Norton et al., 2008) جمعیت مشتق از تلاقی Azucena×Bala را بررسی و ژن‌های کاندیدا را برای QTL‌های خصوصیات مرفولوژی ریشه برنج از قبیل ضخامت ریشه روی کروموزوم‌های ۲، ۵ و ۹ ردیابی کردند. این نواحی به ترتیب شامل ۳۲۲، ۱۸۹ و ۸۱ ژن بودند و به کمک روش‌های ترانسکریپتومیکس مشخص شد که تعداد قابل توجهی از این ژن‌ها از الگوی بیان چند شکل برخوردار هستند. ناحیه مورد بررسی برای QTL بزرگ اثر کروموزوم شماره نه 0.6 Mb بود که بر اساس نتایج حاصل، اهمیت آن در زمینه‌های ژنتیکی مختلف به تأیید رسید. در پژوهش دیگر، این QTL توانست تا ۱۹/۴ درصد از تغییرات فنوتیپی صفت ضخامت ریشه را کنترل کند (McMillan et al., 2006). با بررسی‌هایی که پرایس و همکاران (Price et al., 2000) روی QTL‌های مرتبط با تحمل به خشکی انجام دادند، QTL‌هایی برای مرفولوژی توزیع ریشه، اجتناب از خشکی، توانایی نفوذ ریشه در خاک، تنظیم اسمزی، هدایت روزنه‌ای، پیچیدگی برگ، پایداری غشای سلول، انباشتگی اسید آسزیک و چندین ویژگی فنولوژی دیگر کشف شد. در پژوهش‌های پرایس و همکاران (Price et al., 2000) و نورتون و همکاران (Norton et al., 2008)، نقش این ناحیه از کروموزوم نه برای تحمل به خشکی در برنج مهم معرفی شد. بنابراین، با توجه به اهمیت ویژه این ناحیه از ژنوم، پژوهش حاضر به منظور بررسی تنوع هاپلوتایپی ۲۲ ژنوتیپ بومی و وارداتی برنج زراعی اجرا شد تا ضمن گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها، نشانگرهای آگاهی بخش مرتبط با

خصوصیات ریشه تحت شرایط تنش خشکی جهت استفاده در برنامه‌های انتخاب به کمک نشانگر پیشنهاد شوند.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی مورد ارزیابی شامل ۲۰ ژنوتیپ برنج از منشأ بومی و خارجی (جدول ۱) بود که به همراه ارقام والدینی Bala (متحمل به خشکی) و Azucena (نسبتاً حساس به خشکی) (Norton et al., 2008) از نظر خصوصیات ریشه مورد بررسی قرار گرفتند. آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار تحت شرایط کشت هیدروپونیک در محلول یوشیدا (Yoshida et al., 1976) در آزمایشگاه اصلاح نباتات دانشکده کشاورزی دانشگاه گنبد کاووس در سال ۹۱-۹۲ انجام شد. برای تهیه محیط کشت گیاهچه‌ها از ظروف شیشه‌ای استفاده شد تا امکان مشاهده و ارزیابی مستقیم ریشه‌ها فراهم شود. برای این منظور، بذره‌های جوانه‌دار شده روی سطوح مشبک انتقال یافت و سپس روی ظروف شیشه‌ای حاوی محلول یوشیدا قرار داده شد. تنش خشکی ده روز پس از کشت به وسیله ماده اسموتیک D Manitol به میزان ۵ بار اعمال شد و در شرایط نرمال، گیاهچه‌ها در محلول یوشیدا و بدون افزودن این ماده کشت شدند.

صفات مورد بررسی شامل تعداد ریشه، ضخامت ریشه، طول ریشه، وزن ریشه، طول ساقه، وزن ساقه، زیست توده و کد ژنوتیپی بودند که در مرحله گیاهچه‌ای (۲۷ روز پس از کشت در محلول یوشیدا) تحت هر دو شرایط تنش خشکی و بدون تنش اندازه‌گیری شدند. برای کد ژنوتیپی از خصوصیات ظاهری تحمل به خشکی مانند لوله شدن و میزان سوختگی برگ‌ها استفاده و گیاهچه‌ها از یک تا نه امتیازدهی شدند که عدد یک نشان دهنده تحمل و نه حساس به خشکی بود (Loresto and Chang, 1981; De Datta et al., 1988).

استخراج DNA به روش CTAB (Saghai Maroof et al., 1994) انجام و کمیت و کیفیت نمونه‌ها با استفاده از اسپکتوفتومتری و الکتروفورز ژل آگاروز یک درصد تعیین شد. برای تکثیر جایگاه‌ها از هفده جفت آغازگر ریزماهواره (جدول ۲) استفاده شد. این آغازگرها از گزارشات تمنیخ و همکاران (Temnykh et al., 2000)، مک‌کوش و همکاران (McCouch et al., 2002) و نورتون و همکاران (Norton et al., 2008) انتخاب شدند که پیوستگی این نشانگرها به QTL بزرگ اثر کنترل

کننده مرفولوژی ریشه تحت شرایط تنش خشکی روی کروموزوم نه برنج تایید شده است (Norton et al., 2008). واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) در حجم ۱۲ میکرولیتر شامل ۲ میکرولیتر DNA الگو با غلظت ۱۰ نانوگرم، ۰/۵ میکرولیتر از هر یک از آغازگرها (پیشرفتی و برگشتی) با غلظت ۱۰ پیکومول، ۶ میکرولیتر بافر کیت PCR (Master mix شرکت سیناکلون) و ۱/۵ میکرولیتر آب مقطر انجام شد. چرخه‌های حرارتی شامل یک چرخه واسرشته سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه به مدت ۴ دقیقه، ۳۵ چرخه با واسرشته سازی در دمای ۹۳ درجه به مدت ۴۵ ثانیه، اتصال آغازگر در دمای ۵۸-۵۵ درجه به مدت ۴۵ ثانیه و بسط در دمای ۷۲ درجه به مدت ۴۵ ثانیه و در نهایت یک چرخه بسط نهایی به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۲ درجه بود که با استفاده از دستگاه ترموسایکلر (ICYCLER-BIO-Rad) انجام شد. جداسازی نوارهای تکثیری با الکتروفورز ژل پلی‌اکریلامید واسرشته‌ساز ۶ درصد در دستگاه الکتروفورز عمودی (BIO-Rad Sequencing) انجام و رنگ‌آمیزی به روش نیترات نقره (Creste et al., 2001) انجام شد.

برای تجزیه داده‌ها، ابتدا نرمال بودن داده‌ها بررسی و سپس تجزیه واریانس و مقایسه میانگین‌ها به روش LSD در سطح احتمال پنج درصد با نرم‌افزار SAS 9.0 انجام شد. برای داده‌های مولکولی نیز ابتدا الگوهای نواری حاصل از الکتروفورز محصولات PCR به صورت صفر (عدم وجود نوار) و یک (وجود نوار) امتیازدهی شد. سپس با برنامه Power Marker (Liu and Muse, 2005)، پارامترهای مربوط به جمعیت مانند تنوع ژنی (Osaghi and Akhundova, 2010)، تعداد آلل مشاهده شده، تعداد آلل موثر (Kimura and Crow, 1964)، محتوای اطلاعات چند شکل (PIC) (Prabakaran et al., 2010) و ماتریس فاصله ژنتیکی بر مبنای فاصله جاکارد، محاسبه و سپس تجزیه خوشه‌ای ژنوتیپ‌ها با روش UPGMA انجام شد. برای انجام تجزیه ارتباط و بررسی ارتباط نشانگرهای ریزماهواره با صفات مطالعه شده، رگرسیون گام به گام با نرم‌افزار SPSS 16 (SPSS, 2007) انجام شد. به این ترتیب که مشاهده شده به عنوان متغیرهای مستقل و صفات مورد نظر به عنوان متغیر وابسته به صورت مدل GLM در نظر گرفته شدند. برای کاهش خطای تجزیه رگرسیون، سطح احتمال ۱ درصد برای ورود متغیرها به مدل و ۵ درصد برای خروج از مدل منظور شد.

جدول ۱- ژنوتیپ‌های برنج مورد بررسی به همراه منشاء و شجره آنها

Table 1. The studied rice genotypes

ژنوتیپ Genotype	منشا Origin	ژنوتیپ Genotype	منشا Origin
دیلمانی Deilamani	بومی ایران Iranian landrace	IR77298-14-2-2	ایری IRRI
دمسفید Dom Sefid	بومی ایران Iranian landrace	Bala	بومی هند Indian landrace
دم‌زرد Dom Zard	بومی ایران Iranian landrace	Azucena	بومی فیلیپین Philippine landrace
حسنی Hasani	بومی ایران Iranian landrace	IR82310-B-B-67-2	ایری IRRI
RESTORER-50	ایری IRRI	IR82635-B-B-82-2	ایری IRRI
IR50	ایری IRRI	KMP-41	ایری IRRI
بیجار Bijar	بومی ایران Iranian landrace	IR3441-97	ایری IRRI
موسی طارم Mousa Tarom	بومی ایران Iranian landrace	IRGC-15092-RT-1031-62	ایری IRRI
دشت Dasht	بومی ایران Iranian landrace	IR25571	ایری IRRI
طارم منطقه Tarom Mantagheh	بومی ایران Iranian landrace	بینام Binam	بومی ایران Iranian landrace
زیره Zireh	بومی ایران Iranian landrace	NP-125	ایری IRRI

نتایج و بحث

توده نیز ژنوتیپ IR25571 (به ترتیب با ۰/۱۱ و ۰/۱۷ گرم) دارای بیشترین و Azucena (با ۰/۰۲ گرم) دارای کمترین مقدار بودند. از نظر صفت طول نهایی ساقه، رقم بومی زیره با ۱۸/۳۰ سانتی‌متر بیشترین و Azucena با ۸/۷۵ سانتی‌متر کمترین طول ساقه را داشتند. برای صفت طول نهایی ریشه، رقم بومی دیلمانی (با ۷/۹۳ سانتی‌متر) دارای بیشترین میزان و رقم بومی موسی طارم (با ۲/۵۶ سانتی‌متر) دارای کمترین طول ریشه بودند. بنابراین، با توجه به نتایج به دست آمده در شرایط نرمال، ژنوتیپ‌های دیلمانی، Bala و IR25571 ارزش‌های بالاتر و دشت، موسی طارم، Azucena و RESTORER-50 ارزش‌های پایین‌تری از سایر ارقام مورد مطالعه داشتند.

نتایج حاصل از مقایسه میانگین ژنوتیپ‌ها تحت شرایط خشکی (جدول ۴) نشان داد که برای قطر ریشه، رقم‌های Bala و دمسفید به ترتیب با ۰/۵۹ و ۰/۲۳ سانتی‌متر دارای بیشترین و کمترین مقدار بودند. برای وزن ریشه، IR50 و دشت بیشترین و Azucena کمترین مقدار را

نتایج تجزیه واریانس مرکب بیانگر وجود تفاوت‌های معنی‌دار بین ژنوتیپ‌ها برای کلیه صفات مورد بررسی در مجموع شرایط آزمایش بود. نتایج تجزیه واریانس به تفکیک در هر یک از شرایط نرمال و تنش نیز نشان داد که ژنوتیپ‌های مورد مطالعه از نظر کلیه صفات دارای تفاوت‌های معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد بودند (داده‌ها ذکر نشده‌اند). مقایسه میانگین بین ژنوتیپ‌ها برای صفت قطر ریشه در شرایط نرمال (جدول ۳) نشان داد که ژنوتیپ Bala دارای بیشترین (۰/۸۵ میلی‌متر مربع) و رقم بومی دم‌زرد دارای کمترین (۰/۲۸ میلی‌متر مربع) قطر ریشه بود. در مقابل، برای صفت وزن ریشه، ژنوتیپ‌های IR82310-B-B-67-2، NP-125، IR25571 و دیلمانی، بیشترین میزان و Azucena کمترین مقدار را داشتند. برای صفت تعداد ریشه، IRGC-15092-IR1031-62 با تعداد ۲۳/۳۳ دارای بیشترین و Azucena با تعداد ۲/۸۳ دارای کمترین مقدار بودند. برای صفات وزن ساقه و زیست

طول نهایی ساقه، Bala برای طول نهایی ریشه، Azucena برای کد ژنوتیپی و RESTORER-50 برای زیست توده، بیشترین مقادیر را به خود اختصاص دادند.

داشتند. برای تعداد ریشه، Bala و Azucena به ترتیب دارای بیشترین و کمترین تعداد بودند. ارقام IR25571، دیلمانی، دم سفید و زیره نیز برای وزن ساقه، دیلمانی برای

جدول ۲- نشانگرهای استفاده شده و توالی آنها (Temnykh *et al.*, 2000; McCouch *et al.*, 2002; Norton *et al.*, 2008)

Table 2. Studied markers and their sequences (Temnykh *et al.*, 2000; McCouch *et al.*, 2002; Norton *et al.*, 2008)

نشانگر Marker	آغازگر پیشرفتی Forward Primer 5'→3'	آغازگر برگشتی Reverse Primer 3'→5'	فاصله تا هدف QTL Distance to target QTL
RM288	ATGCCGCCAGTGAAAAGC	CTGAGAATCCAATTATCTGGGG	5.4
RM553	ACAAAACCAAGGGCCTAACC	CTTCGTGCGAGCCATCTC	3.3
RM278	GCGCTGGTGGAAAATGAG	GGCATCCCTCTTTGATTCCTC	2.5
RM201	GAAACCACCACACCTCACCG	CCGTAGACCTTCTTGAAGTAG	1.2
RM107	GGTGCCATTGTCGTCCTC	ACGGCCCTCATCACCTTC	2.4
RM160	AGATCGAAGCATCGCGCCCGAG	ACTGCGTCCTCTGGGTTCCCGG	2.4
RM328	GTTGCACTACGTATTCTGAG	GATCCAGATAAATGAGGCAC	2.4
RM215	GGTCCTGGGTCAATAATTGGGTACC	TTGCTGCATGATCCTAAACCGG	3.3
RM245	CAGATTGGAGATGAAGTCTCTCC	CCAGCAAGCATGTCAATGTA	2.6
RM205	GCCGCACCCTCACTCCCTCCTC	TCTTGCCGAGCGCTTGAGGTG	3.4
RM24626	CTCCTCCTCGCCTTAGCTTTCC	CCTGCCTGTTGATCTTGTCTCG	2.9
RM24627	GGTCATTGTTGGTTGTTAGCC	GCAAAGTTTCGATGTGATGG	3.3
RM24651	GTGCGGACTCTAATATGTCG	GAGTCTGCACCATCTATTTGC	3.7
RM24653	TCTGCGAAATAAGTGGAACG	GATGTCGAAAGTTGAAACC	4.4
RM24669	TGAGGCTGTCTAAGTAGGATTCG	GACTTCAGAACCACCACACC	2.6
RM24671	CAGATTATCTTCTCCTCCATACC	CTCTTCATCCGATAGTTTGCTAGG	4.7
RM24713	GAATTGGGCGTAATTCATCC	CCTTGTCGTCAGACTGTTTC	2.9

ریشه‌های عمیق‌تری در شرایط تنش خشکی ایجاد کنند، نسبت به خشکی متحمل‌تر خواهند بود. سینگ و همکاران (Singh *et al.*, 2000) نیز با بررسی صفات ریشه تحت شرایط تنش خشکی بیان داشتند که گیاهانی که طول ریشه اصلی، تعداد ریشه‌های جانبی، تراکم طول ریشه و نسبت ریشه به اندام هوایی بالاتری دارند، نسبت به کم آبی و تنش خشکی متحمل‌تر هستند. به طور کلی، گیاه هنگام مواجهه با تنش خشکی، برای اینکه توانایی جذب ریشه را افزایش دهد ماده خشک بیشتری را به سیستم ریشه‌ای اختصاص می‌دهد و در نتیجه تغییراتی در خصوصیات مرفولوژیک ریشه‌ها مانند افزایش طول ریشه‌ها در واحد وزن ایجاد می‌شود (Aerts and chapin, 1999). با توجه به نتایج این پژوهش، ژنوتیپ‌های Bala, IR25571 و دیلمانی که از لحاظ اکثر صفات مهم و موثر در تحمل به تنش خشکی ارزش‌های بالاتری را در بین سایر ژنوتیپ‌ها به خود اختصاص دادند، احتمالاً تحمل بیشتری از سایر ارقام نسبت به تنش خشکی دارند. در مقابل، ارقام Azucena، موسی طارم و دم‌زرد، ارزش‌های کمتری داشتند و احتمالاً حساس‌تر به خشکی هستند.

پژوهش‌های مختلف نشان داده‌اند که بررسی صفات مرفولوژیک ساقه و به ویژه ریشه در ارزیابی تحمل به تنش خشکی در برنج حایز اهمیت هستند. به عنوان نمونه، وانگ و همکاران (Wang *et al.*, 2006) روی مجموعه‌ای از ویژگی‌های ریشه و ساقه، شامل توسعه ریشه، حداکثر عمق ریشه، مجموع طول ریشه، مساحت ریشه، حجم ریشه، ضخامت ریشه، قابلیت نفوذ ریشه در سخت لایه، هدایت هیدرولیکی ریشه، نسبت ریشه به ساقه، منشعب شدن ریشه، ساقه و مجموع طول گیاه، مطالعه کردند و نشان دادند که این ویژگی‌ها واکنش‌های قابل توجهی به خشکی نشان می‌دهند و می‌توانند در تفکیک ارقام متحمل و حساس به خشکی موثر باشند. از آنجایی که توانایی نفوذ ریشه‌ها در خاک بستگی به ضخامت آنها دارد، از این رو ریشه‌های ضخیم‌تر نقش مستقیمی در تحمل به خشکی دارند (Clark *et al.*, 2008).

ویرش و همکاران (Veeresh *et al.*, 2011) بیان کردند که رسیدن به حداکثر عمق ریشه یک ویژگی ژنتیکی است و از این لحاظ، تفاوت قابل ملاحظه‌ای بین ارقام در شرایط یکسان وجود دارد. ارقامی که قادر باشند

جدول ۳- مقایسه میانگین ژنوتیپ‌های برنج مورد مطالعه تحت شرایط نرمال

Table 3. Mean comparison of the studied rice genotypes under normal condition

ژنوتیپ Genotype	قطر ریشه Root diameter (mm ²)	وزن ریشه Root weight (g)	تعداد ریشه Root number	وزن ساقه Shoot weight (g)	طول ساقه Shoot length (cm)	طول ریشه Root length (cm)	زیست توده Biomass
IR77298-14-2-2	0.38	0.05	18.66	11.46	0.10	3.60	0.15
Bala	0.85	0.04	7.20	14.72	0.08	6.76	0.12
Azucena	0.30	0.00	2.83	8.75	0.02	4.15	0.02
IR82310-B-B-67-2	0.34	0.03	15.66	12.76	0.06	4.60	0.10
IR82635-B-B-82-2	0.29	0.06	17.66	15.58	0.08	2.73	0.14
KMP-41	0.47	0.05	16.66	10.43	0.04	6.36	0.09
IR3441-97	0.39	0.04	16.33	11.10	0.04	6.30	0.09
IRGC-15092-RT-1031-62	0.51	0.04	23.33	17.70	0.05	4.16	0.10
IR25571	0.38	0.06	21.33	13.66	0.11	5.23	0.17
بینام Binam	0.45	0.04	18.66	10.26	0.05	5.20	0.09
NP-125	0.49	0.06	17.33	12.46	0.06	5.96	0.13
دیلمانی Deilamani	0.40	0.06	17.33	0.09	17.06	7.93	0.16
دم سفید Dom Sefid	0.35	0.05	22.33	0.10	18.00	5.23	0.16
دم زرد Dom Zard	0.28	0.04	16.33	0.06	18.53	5.86	0.10
حسنی Hasani	0.30	0.03	21.00	0.08	13.50	6.06	0.12
RESTORER-50	0.31	0.03	16.33	0.05	12.13	4.73	0.08
IR50	0.37	0.05	21.33	0.06	14.33	4.83	0.11
بیجار Bijar	0.31	0.04	15.66	0.06	17.43	5.23	0.11
موسی طارم Mousa Tarom	0.38	0.02	17.00	0.05	10.50	2.56	0.07
دشت Dasht	0.45	0.05	10.33	0.06	9.66	5.33	0.11
طارم منطقه Tarom Mantagheh	0.44	0.03	15.00	0.05	11.66	7.73	0.08
زیره Zireh	0.30	0.03	17.33	0.06	18.30	5.63	0.10
LSD _{5%}	0.1013	0.0203	4.6111	0.0271	3.642	1.51	0.0375

بررسی تنوع آلی

بررسی ژنوتیپ‌های مورد بررسی از لحاظ نشانگرهای ریزماهواره پیوسته به QTL بزرگ اثر مرفولوژیک ریشه روی کروموزوم ۹ (Norton *et al.*, 2008)، نشان داد که این ژنوتیپ‌ها تنوع آلی مناسبی در این ناحیه ژنومی دارند. در مجموع، تجزیه داده‌های حاصل از نشانگرها بیانگر وجود ۴۲ آلل چند شکل بود. تعداد آلل برای هر نشانگر از ۲ تا ۴ آلل و میانگین آنها ۲/۸ آلل برای هر نشانگر بود (جدول ۵). بیشترین تعداد آلل در جایگاه‌های

RM24713، RM24671 و RM107 و کمترین آن در نشانگرهای RM205، RM215، RM288، RM24626، RM24651 و RM24653 مشاهده شد. محتوی اطلاعات چند شکل (PIC) از ۰/۲۹ تا ۰/۶۲ و میانگین آن ۰/۴۳ بود. بیشترین مقدار PIC در نشانگرهای RM201، RM245 و RM24671 و کمترین مقدار آن در نشانگرهای RM215، RM288 و RM24626 برآورد شد. مقدار تنوع ژنی نیز بین ۰/۳۵۱ تا ۰/۶۷۷ و میانگین آن ۰/۵۱ بود. کمترین مقدار تنوع ژنی در نشانگرهای

شکل و تنوع ژنی در این مطالعه، به عنوان نشانگرهای مفید جهت بررسی تنوع ژنتیکی شناسایی شدند. این نشانگرها با داشتن آماره‌های تنوع بالاتر از قدرت تفکیک بیشتری برخوردار هستند و احتمالاً بتوان از آنها در غربال ژنوتیپ‌ها بهره بیشتری برد. از آنجا که نشانگرهای مورد استفاده در این مطالعه به ناحیه‌ای از ژنوم مربوط می‌شوند که پیوسته به QTL بزرگ‌اثر کنترل کننده تحمل به خشکی هستند، از این‌رو شاید بتوان این نشانگرها را به عنوان نشانگرهای آگاهی بخش جهت غربال ژنوتیپ‌های متحمل و حساس به خشکی پیشنهاد کرد.

RM215، RM288 و RM24626 و بیشترین آن در نشانگرهای RM245، RM553 و RM24671 مشاهده شد. میانگین‌های تعداد آلل موثر، ارزش PIC و تنوع ژنی مشاهده شده در جایگاه‌های ریزماهواره، بیانگر کارآمدی نشانگرهای استفاده شده برای تمایز ژنتیکی ژنوتیپ‌ها و وجود تنوع بین ژنوتیپ‌های برنج مورد مطالعه می‌باشد (Roder *et al.*, 1998). وجود این تنوع کافی، امکان تجزیه ارتباط بهتری را با صفات اندازه‌گیری شده فراهم می‌کند. در مجموع، نشانگرهای RM245 و RM24671 با دارا بودن بیشترین تعداد آلل، محتوی اطلاعات چند

جدول ۴- مقایسه میانگین صفات در ژنوتیپ‌های برنج مورد مطالعه تحت شرایط تنش

Table 4. Mean comparison of the studied rice genotypes under drought stress condition

ژنوتیپ Genotype	قطر ریشه Root diameter (mm ²)	وزن ریشه Root weight (g)	تعداد ریشه Root number	وزن ساقه Shoot weight (g)	طول ساقه Shoot length (cm)	طول ریشه Root length (cm)	کد ژنوتیپی Genotypic code	زیست توده Biomass
IR77298-14-2-2	0.29	0.01	12.33	0.02	12.88	4.86	7.66	0.03
Bala	0.59	0.01	15.20	0.03	18.96	9.12	1.66	0.05
Azucena	0.24	0.00	4.33	0.01	9.96	7.35	8.33	0.01
IR82310-B-B-67-2	10.30	0.01	12.66	0.02	11.70	3.83	7.33	0.03
IR82635-B-B-82-2	0.23	0.01	9.33	0.05	14.40	4.50	5.33	0.06
KMP-41	0.39	0.01	8.66	0.03	11.03	4.93	6.33	0.04
IR3441-97	0.29	0.00	8.00	0.04	11.80	5.11	5.33	0.05
IRGC-15092-RT-1031-62	0.43	0.01	8.66f	0.03	11.16	3.66	5.33	0.05
IR25571	0.36	0.01	15.00	0.06	17.03	3.66	4.66	0.07
بینام Binam	0.29	0.01	6.33	0.04	9.86	4.26	7.00	0.05
NP-125	0.36	0.01	14.33	0.05	11.60	5.16	7.66	0.07
دیلمانی Deilamani	0.40	0.01	11.33	0.06	23.00	7.00	3.33	0.07
دم‌سفید Domsefid	10.30	0.01	8.33	0.06	15.00	4.50	5.33	0.07
دم‌زرد Domzard	0.23	0.01	13.00	0.05	12.66	4.86	5.66	0.07
حسنى Hasani	10.30	0.01	9.33	0.05	13.86	5.43	5.66	0.07
RESTORER-50	0.26	0.04	8.00	0.05	11.80	2.83	7.33	0.09
IR50	0.35	0.02	8.00	0.05	13.93	4.16	5.66	0.08
بیجار Bijar	10.33	0.01	8.00	0.05	17.36	2.66	4.66	0.06
موسی طارم Mousa Tarom	0.33	0.01	11.00	0.04	11.50	2.40	6.33	0.05
دشت Dasht	0.43	0.02	12.00	0.04b	9.40	4.16	8.00	0.07
طارم منطقه Tarom Mantagheh	0.36	0.01	6.00	0.03	10.00	5.66	7.66	0.04
زیره Zireh	0.25	0.01	11.66	0.06	14.56	5.00	5.66	0.07
LSD 5%	0.0971	0.0117	2.7994	0.0233	4.2066	1.3712	1.0328	0.0299

جدول ۵- فراسنجه‌های تنوع نشانگرهای ریزماهواره در ژنوتیپ‌های برنج مورد مطالعه در این پژوهش

Table 5. Diversity parameters of the microsatellite markers in the studied rice genotypes in this research

نشانگر	محتوی اطلاعات چندشکل	تعداد آل موثر	تعداد آل مشاهده شده	تنوع ژنی
Marker	PIC	Ne	Na	Gene diversity
RM24653	0.372	1.98	2	0.495
RM24669	0.422	2.06	3	0.516
RM553	0.851	2.49	3	0.599
RM278	0.431	2.14	3	0.533
RM24713	0.504	2.20	4	0.545
RM24626	0.289	1.54	2	0.351
RM288	0.289	1.54	2	0.351
RM24651	0.375	2.00	2	0.500
RM215	0.289	1.54	2	0.351
RM24671	0.623	3.10	4	0.677
RM245	0.554	2.71	3	0.632
RM205	0.355	1.86	2	0.462
RM201	0.532	2.49	3	0.599
RM107	0.419	1.80	4	0.446
RM160	0.490	2.26	3	0.557

تحمل به تنش خشکی دارند. جهت ارزیابی بهتر و دقیق‌تر این نوع روابط بین ویژگی‌های فنوتیپی و ژنتیکی و شناسایی نشانگرهای آگاهی بخش توجیه کننده تغییرات صفات مورد مطالعه از روش تجزیه ارتباط استفاده شد.

نتایج تجزیه ارتباط بین نشانگرها و صفات مورد مطالعه تحت شرایط تنش در جدول ۶ ارائه شده است. نتایج نشان داد که نشانگرهای RM530-A با ضخامت ریشه (B=0.431)، RM24627-A با وزن ریشه (B=0.573)، RM24669-C با تعداد ریشه (B=0.620)، RM6535-C با وزن ساقه (B=-0.503)، RM684-A با طول ساقه (B=0.832)، RM160-A با طول ریشه (B=0.373)، RM684-A با کد ژنوتیپی (B=-0.811) و RM24627-A با زیست توده (B=1.073) دارای بیشترین ضریب رگرسیون استاندارد شده بودند. از آنجایی که نشانگرهای RM160، RM24627 و RM24671 ارتباط معنی‌داری با بیشترین تعداد صفات در این ژنوتیپ‌ها داشتند و از طرفی نشانگرهای RM684 و RM24669 نیز دارای ضریب رگرسیون بالایی بودند، بر این اساس احتمالاً این نشانگرها با QTL بزرگ‌اثر کنترل کننده صفات ریشه روی کروموزوم شماره نه پیوستگی بالایی دارند. در صورتی که این نشانگرها در تحقیقات بعدی تحمل به خشکی نیز مورد تایید قرار گیرند، در این صورت می‌توان از آنها به عنوان نشانگرهای کاندیدا برای انتخاب به کمک نشانگر در برنامه‌های به‌نژادی بعدی استفاده کرد. لین و همکاران (Lin et al., 2007) نیز چهار نشانگر ریزماهواره پیوسته

نتایج تجزیه خوشه‌ای داده‌های ژنتیکی بر اساس ضریب جاکارد و روش گروه‌بندی UPGMA که بالاترین ضریب همبستگی کوفنتیک و بهترین توپولوژی دندروگرام را به خود اختصاص داد، در شکل ۱ ارائه شده است. بر این اساس، ژنوتیپ‌های مورد مطالعه به دو گروه اصلی تقسیم شدند، به طوری که ژنوتیپ‌های دیلمانی، حسنی، بیجار، موسی طارم، طارم منطقه، Bala، KMP-41، IR25571، IRGC-15092-RT-1031-62 و IR50 در گروه اول و ژنوتیپ‌های بینام، دم‌سفید، دم‌زرد، دشت، زیره، Azucena، IR77298-14-2-2، IR82635-B-B-82-2، NP-125 و IR3441-97 در گروه دوم قرار گرفتند. گروه یک شامل ژنوتیپ‌هایی بود که بیشترین شباهت را به Bala داشتند، ضمن اینکه سه ژنوتیپ Bala، R25571 و دیلمانی در یک گروه قرار گرفتند که موید نتایج حاصل از مقایسه میانگین‌ها است. این ژنوتیپ‌ها با داشتن صفات ریشه‌ای بهتر (مانند تعداد ریشه‌ها و ضخامت ریشه بیشتر)، نسبت به سایر ژنوتیپ‌ها تحمل بیشتری به خشکی نشان دادند. در مقابل، گروه دوم به ژنوتیپ‌هایی اختصاص یافت که در مجموع و به ویژه از نظر صفات ریشه ضعیف‌تر از گروه اول بودند. این نوع تفکیک ژنوتیپ‌ها که اساساً بر مبنای داده‌های ژنتیکی صورت گرفته، اما توانسته است تا حدود زیادی گویای اختلافات فنوتیپی بین ژنوتیپ‌ها باشد، می‌تواند نوید بخش این مطلب باشد که QTL بزرگ‌اثر مورد نظر و البته نشانگرهای ریزماهواره مورد مطالعه، نقش قابل توجهی در توجیه تغییرات فنوتیپی کنترل کننده صفات ریشه در

۸، ۱۰ و ۱۲ را برای گزینش اولیه لاین‌های متحمل به خشکی مورد استفاده قرار دادند و ضمن آسان نمودن برنامه گزینش، دوره‌های اصلاحی را کوتاه کردند.

به QTL‌های متحمل به خشکی شامل RM72، RM518، RM228، RM20 به ترتیب با فاصله ۴/۱، ۸/۱، ۱۰/۱ و ۱۲/۱ سانتی‌مورگان روی کروموزوم‌های ۴،

جدول ۶- ضریب تبیین مدل رگرسیون و ضریب رگرسیون استاندارد شده نشانگرهای ریزماهوره مرتبط با صفات مطالعه شده در برنج
Table 6. Coefficient of model determination and standardized regression coefficient of microsatellite markers linked to the studied traits in rice

صفت Trait	آلل نشانگر Marker allele	ضریب رگرسیون استاندارد شده Standardized regression coefficient (Beta)	ضریب تبیین مدل Model R ²
ضخامت ریشه Root thickness	RM245-B	-0.380*	0.589
	RM530-A	0.431*	
	RM24671-C	0.330*	
وزن ریشه Root weight	RM24627-A	0.573**	0.442
	RM160-C	0.390*	
تعداد ریشه Root number	RM245-C	0.578**	0.726
	RM160-B	0.459**	
	RM24669-C	0.620**	
	RM24627-C	-0.405**	
وزن ساقه Shoot weight	RM6535-C	-0.503*	0.253
طول ساقه Shoot length	RM684-A	0.832**	0.777
	RM24671-D	-0.366**	
	RM107-A	0.295**	
طول ریشه Root length	RM160-A	0.373*	0.289
	RM245-A	0.366*	
کد ژنوتیپی Genotypic code	RM684-A	-0.811**	0.874
	RM24671-D	0.496**	
	RM160-C	-0.302**	
	RM24671-A	0.288**	
	RM24626-A	-0.227**	
زیست توده Biomass	RM24627-A	1.073**	0.632
	RM278-B	0.426*	
	RM24671-D	-0.747**	
	RM201-B	0.340*	

باشد. به همین دلیل است که نتایج یک QTL در یک جمعیت، ممکن است در جمعیت یا ژرم پلاسما دیگر کاملاً مشابه نباشد. بنابراین، نتایج ارزیابی QTL مهم موثر بر تنش خشکی روی کروموزوم شماره نه که قبلاً در زمینه ژنتیکی ژرم پلاسما برنج غیر ایرانی شناسایی شده است، در جمعیت ایرانی بسیار حایز اهمیت بوده و در صورت تایید می‌تواند در تحقیقات بعدی به ویژه برای توسعه

تحمل به خشکی صفت کمی مهم و پیچیده‌ای است که توسط ژن‌ها و QTL‌های متعددی کنترل می‌شود. از آنجا که بروز یک فنوتیپ همانند تحمل به تنش در نتیجه تظاهر ژن‌ها به طور مستقل نبوده و در حقیقت برآیند عملکرد ژن‌های متعددی در یک شبکه پیچیده و تنظیم شده است، از این‌رو زمینه ژنتیکی افراد می‌تواند در بروز فنوتیپی ویژگی پیچیده‌ای مانند تحمل به یک تنش موثر

کند. از این رو می‌تواند برای مکان‌یابی دقیق و در نهایت همسانه‌سازی در تحقیقات بعدی بهره‌بردار شود.

تشکر و قدردانی

از کارشناسان آزمایشگاه‌های گیاهشناسی و ژنتیک دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه گنبد کاووس سپاسگزاری می‌شود. از جناب آقای مهندس احمدرضا دادرس دانشجوی دکتری اصلاح نباتات دانشکده علوم کشاورزی دانشگاه گیلان نیز که در تمامی مراحل اجرای این پژوهش یار و یاور ما بودند، تشکر و قدردانی می‌شود.

نشانگرهای آگاهی بخش و معرفی آنها برای انتخاب به کمک نشانگر پیشنهاد شود.

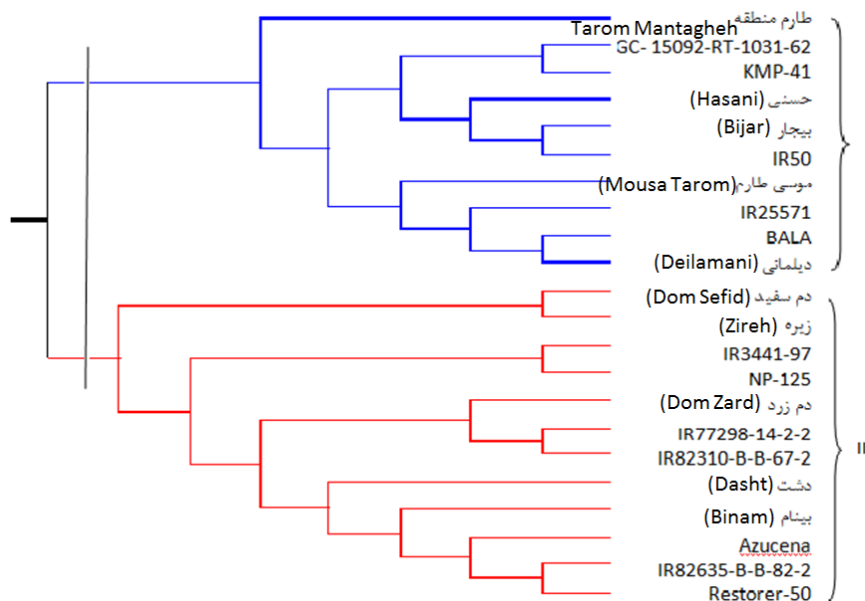
بر اساس نتایج این تحقیق، رقم محلی دیلمانی به عنوان یک رقم متحمل به خشکی می‌تواند در برنامه‌های به‌نژادی در نظر گرفته شود. نشانگرهای RM160، RM24713 و RM24671 نیز پس از انجام آزمون‌های بیشتر و تایید نتایج می‌توانند به عنوان نشانگری آگاهی بخش برای انتخاب و غربال جمعیت‌ها برای تحمل به خشکی پیشنهاد شوند. به نظر می‌رسد این ناحیه ژنومی در برنج می‌تواند نقش قابل توجهی در تحمل به تنش ایفا

جدول ۷- شانزده هاپلوتایپ برنج شناسایی شده با نشانگرهای SSR مورد مطالعه در مقایسه با ژنوتیپ Bala
Table 7. Sixteen rice haplotypes identified by the studied SSR markers compared with Bala

نشانگر Marker	هاپلوتایپ Haplotype																
	Bala	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
RM24651																	
RM215																	
RM24671																	
RM205																	
RM245																	
RM24653																	
RM24669																	
RM553																	
RM278																	
RM24713																	
RM328																	
RM24627																	
RM24626																	
RM288																	
RM201																	
RM107																	
RM160																	

* هاپلوتایپ‌ها عبارت‌اند از: ۱- بینام، ۲- حسنی، بیجار و IR50، ۳- IR77298-14-2-2، ۴- IR82310-B-B-67-2، ۵- IR3441-97، ۶- IR82635-B-B-82-2 و RESTORER-50، ۷- دم‌زرد، ۸- دیلمانی و IR25571، ۹- IRGC-15092-RT-1031-62، ۱۰- KMP-41، ۱۱- دم‌سفید، ۱۲- NP-125، ۱۳- موسی طارم، ۱۴- طارم منطقه، ۱۵- زیره و ۱۶- دشت.

* The haplotypes are including: 1. Binam, 2. Hasani, Bijar and IR50, 3. IR77298-14-2-2, 4. IR82310-B-B-67-2, 5. IR3441-97, 6. IR82635-B-B-82-2, 7. Domzard, 8. Deilamani and IR25571, 9. IRGC-15092-RT-1031-62, 10. KMP-41, 11. Domsefid, 12. NP-125, 13. Mousa Tarom, 14. Tarom Mantagheh, 15. Zireh and 16. Dasht.



شکل ۱- خوشه‌بندی ژنوتیپ‌های مورد بررسی با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره متصل به QTL کنترل کننده تحمل به خشکی روی کروموزوم ۹ بر اساس ضریب جاکارد و روش گروه‌بندی UPGMA

Figure 1- Clustering of the studied genotypes using microsatellite markers linked to the QTL controlling drought tolerance on chromosome 9 based on Jaccard's coefficient and UPGMA method

References

- Aerts, R. and Chapin, F. S. 1999.** The mineral nutrition of wild plants revisited: A re-evaluation of processes and patterns. *Advances in Ecological Research* 62: 26-34.
- Babu, R. Ch. 2010.** Breeding for through resistance in rice: An integrated view from physiology to genomics. *Electronic Journal of Plant Breeding* 1 (4): 1133-1141.
- Bai, G., Peiguo, G. and Kolb, F. L. 2003.** Genetic relationships among head blight-resistant cultivars of wheat assessed on the basis of molecular markers. *Crop Science* 43:498-507.
- Blum, A. 1996.** Crop responses to drought and the interpretation of adaptation. *Plant Growth Regulation* 20: 135-148.
- Blum, A. 2011.** Drought tolerance- Is it really a complex trait? *Functional Plant Biology* 38 (10): 753-757.
- Clark, L. J., Price, A. H., Steele, K. A. and Whalley, W. R. 2008.** Evidence from near-isogenic lines that root penetration increases whit root diameter and bending stiffness in rice. *Plant Biology* 35: 1163-1171.
- Creste, S., Tulmann Neto, A. and Figueria, A. 2001.** Detection of single sequence repeat polymorphism in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. *Plant Molecular Biology Reporter* 19: 2999-3006.
- De Datta, S. K., Malabuyoc, J. A. and Aragon, E. L. 1988.** A field screening technique for evaluating rice germplasm for drought tolerance during vegetative stage. *Field Crops Research* 19: 123-124.
- FAO. 2012.** Projection of rice production, consumption and trade to the year. <http://www.fao.org>.
- Gebhardt, C., Ballvora, A., Walkemeier, B., Oberhagemann, P. and Schuler, K. 2004.** Assessing genetic potential in germplasm collections of crop plants by marker-trait association: A case study for potatoes with quantitative variation of resistance to late blight and maturity type. *Molecular Breeding* 13: 93-102.
- Lin, M. H., Lin, C. W., Chen, J. C., Lin, Y. C., Cheng, S. Y., Liu, T. H., Jan, F. J., Wu, S. T., Thseng, F. S. and Ku, H. M. 2007.** Tagging rice drought-related QTL with SSR DNA Markers. *Crop, Environment and Bioinformatics* 4: 65-76.

- Liu, K. and Muse, S. V. 2005.** Power marker. An integrated analysis environment for genetic marker analysis. *Bioinformatics* 21: 2128-2129.
- Liu, G., Mei, H., Liu, H., Yu, X., Zou, G. and Luo, L. 2010.** Sensitivities of rice grain yield and other panicle characters to late-stage drought stress revealed by phenotypic correlation and QTL analysis. *Molecular Breeding* 25: 603-613.
- Loresto, G. C. and Chang, T. T. 1981.** Decimal scoring system for drought reactions and recovery ability in rice screening nurseries. *International Rice Research Notes* 6 (2): 9-10.
- McCartney, C. A., Sommers, D. J., Fedak, G. and Cao, W. 2004.** Haplotype diversity at Fusarium head blight resistance QTLs in wheat. *Theoretical and Applied Genetics* 109: 261-271.
- McCouch, S. R., Teytelman, L., Xu, Y. B., Lobos, K. B., Clare, K., Walton, M., Fu, B., Maghirang, R., Li, Z. K., Xing, Y. Z., Zhang, Q. F., Kono, I., Yano, M., Fjellstrom, R., DeClerck, G., Schneider, D., Cartinhour, S., Ware, D. and Stein, L. 2002.** Development and mapping of 2240 new SSR markers for rice (*Oryza sativa* L.). *DNA Research* 9: 199-207.
- McMillan, K., Emrich, K., Piepho, H., Mullins, C. E. and Price, A. H. 2006.** Assessing the importance of genotype×environment interaction for root traits in rice using a mapping population. II. Conventional QTL analysis. *Theoretical and Applied Genetics* 113: 953-964.
- Naghavi, M. R., Mardi, M., Ramshini, H. A. and Fazelinasab, B. 2004.** Comparative analyses of the genetic diversity among bread wheat genotypes based on RAPD and SSR markers. *Iranian Journal of Biotechnology* 2: 195-202. (In Persian).
- Norton, G. J., Aitkenhead, M. J., Khowaja, F. S., Whalley, W. R. and Price, A. H. 2008.** A bioinformatic and transcriptomic approach to identifying positional candidate genes without fine mapping: An example using rice root-growth QTLs. *Genomics* 92: 344-352.
- Ojaghi, J. and Akhundova, E. 2010.** Genetic diversity in doubled haploid wheat according to the acid-PAGE method, morphological traits and baking quality. *Turkish Journal of Biology* 34: 343- 353.
- Prabakaran, A., Paramasivam, K., Rajesh, T. and Rajarajan, D. 2010.** Molecular characterization of rice land races using SSR marker. *Electronic Journal of Plant Breeding* 1 (4): 512-516.
- Price, A. H., Steele, K. A., Moore, B. J., Barraclough, P. B. and Clark, L. J. 2000.** A combined RFLP and AFLP linkage map of upland rice (*Oryza sativa* L.) used to identify QTLs for root penetration ability. *Theoretical and Applied Genetics* 100: 49-56.
- Roder, M. S., Korzun, V., Wendehake, K., Plaschke, J., Tixier, M. H., Leroy, P. and Ganal, M. W. 1998.** A microsatellite map of wheat. *Genetics* 149: 2007-2023.
- SAS. 2002.** The SAS system for windows. Release 9.0. SAS Institute. Cary, NC, USA.
- Singh, R. K., Singh, C. V., Sinha, P. K., Singh, V. P., Maiti, D. and Prasad, K. 2000.** Effect of soil texture, moisture regimes and cultivars on root and shoot development in upland rice (*Oryza sativa* L.). *Agriculture Science* 70: 730-735.
- SPSS. 2007.** The SPSS system for windows. Release 16.0.SPSS Inc., IBM Company Headquarters, USA.
- Temnykh, S., Park, D. W., Ayres, N., Cartinhour, S., Hauck, N., Liporich, L., Cho, Y. G., Ishii, T. and McCouch, S. R. 2000.** Mapping and genome organization of microsatellite sequences in rice (*Oryza sativa* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 100: 697-712.
- Veeresh, R. P. G., Henry, A., Yamauchi, A., Shashidhar, H. E. and Serraj, R. 2011.** Root biology and genetic improvement for drought avoidance in rice. *Field Crops Research* 122 (1): 1-13.
- Wang, H., Inukai, Y. and Yamauchi, A. 2006.** Root development and nutrient uptake. *Plant Science* 25: 279-301.
- Yoshida, S., Forno, D. A., Cock, J. H. and Gomez, K. A. 1976.** Laboratory Manual for Physiological Studies of Rice. IRRI, Losbanos, Philippines.
- Yu, J. B. and Ban, T. 2006.** Marker-assisted characterization of Asian wheat lines for resistance to fusarium head blight. *Theoretical and Applied Genetics* 113: 308-320.
- Yue, B., Xue, W., Xing, Y., Jin, D., Xiong, L. and Zhang, Q. 2004.** QTL mapping of drought resistance at late growing stage in rice. Resilient Crops for Water Limited Environments. Proceeding of a Workshop. May 24-28, Cuernavaca, Mexico. pp: 254-256.

Evaluation of haplotype and allelic diversity of SSR markers linked to major effect QTL on chromosome 9 controlling drought tolerance in rice

Roghaye Tavala¹, Ali Aalami², Hossein Sabouri^{3*} and Atefeh Sabouri²

1 and 2. M. Sc. Student and Assist. Prof., respectively, Dept. of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Iran, 3. Assoc. Prof., Dept. of Plant Production, College of Agriculture and Natural Resources, Gonbad Kavous University, Iran

(Received: January 18, 2014- Accepted: October 27, 2014)

Abstract

To study the haplotype and allelic diversity and to identify the informative markers of root characteristics of some rice genotypes under drought stress, 17 microsatellite markers linked to the major QTL located on the rice chromosome 9 controlling root morphologic characteristics under drought stress were used. Based on the genetic data, the studied rice genotypes were assigned into two groups. The genotypes of first group including Bala were more tolerant and the genotypes of other group had lower root characteristics and were more drought sensitive. Results of the molecular analysis showed that RM215 and RM24671 markers at this chromosomal region had the most allelic variation. The association analysis between markers and traits under stress condition were revealed that the SSR markers RM530-A with root thickness ($B=0.431$), RM24627-A with root weight ($B=0.573$), RM24669-C with root number ($B=0.620$), RM6535-C with stem weight ($B=-0.503$), RM684-A with stem length ($B=0.832$), RM160-A with root length ($B=0.373$), RM684-A with genetic code ($B=-0.811$) and RM24627-A with biomass ($B=1.073$) had the highest standardized regression coefficient and can be used in the breeding programs as informative markers, if the results are confirmed by further experiments. Results of the haplotype analysis divided twenty two genotypes into 16 different haplotypes and the haplotype 8 consisting of Deilamani and IR25571 had the maximum similarity to Bala. It seems that this similar genotypes to Bala be included the QTLs controlling drought tolerance at this genome region. These genotypes can be used for drought tolerance breeding programs after validation of the results in subsequent experiments.

Keywords: Association analysis, Drought stress, Haplotype, Informative marker

*Corresponding author: sabouriho@yahoo.com