شناسایی نشانگرهای ISSR، IRAP و iPBS حاوی اطلاعات برای ویژگی‌های برنج در دو شرایط غرقاب و تنش خشکی

حال بی‌بی بادیردست[۱]، سید یحیی صالحی لیسار[۱]، حسین صبوری[۲]، علی موافقی[۱] و ابراهیم غلامعلی‌پور علمداری[۲]

[۱] ایران، تبریز، دانشگاه تبریز، دانشکده علوم طبیعی، گروه علوم گیاهی

[۲] ایران، گنبدکاووس، دانشگاه گنبدکاووس، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی گنبدکاووس، گروه تولیدات گیاهی

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۳/۱۰ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۹/۲۴

چکیده

برنج غذای اصلی بیش از نیمی از مردم جهان را تأمین می‌کند. با توجه به نیاز آبی بالای برنج و کمبود منابع آبی، خشکی همواره یکی از عوامل محدودکننده کشت این گیاه می‌باشد. بنابراین این تحقیق به‌منظور بررسی تنوع ژنتیکی و شناسایی نشانگرهای ISSR، IRAP و iPBS حاوی اطلاعات ۲۳ صفت مورفولوژیکی در دو شرایط غرقاب و تنش آبی با استفاده از ۱۱۲ ژنوتیپ برنج انجام شد. نتایج حاصل از رگرسیون چند متغیره نشان داد که درمجموع ۱۳۷ و ۱۲۰ نوع آلل به ترتیب در شرایط بدون تنش و تنش خشکی با حداقل یکی از صفات مورد بررسی پیوستگی معنی‌دار داشتند. ضریب تبیین در مجموع نشانگرهای آگاهی‌بخش در شرایط بدون تنش از ۹۸/۰ الی ۲۲/۰ درصد و در شرایط تنش خشکی نیز از ۸۹/۰ تا ۲۵/۰ درصد متغیر بود. در شرایط بدون تنش آلل iPBS2224-6 برای صفت طول برگ پرچم (۹۸/۰) و در شرایط تنش خشکی آلل ISSR16-6 برای صفت وزن کل خوشه‌ها (۸۹/۰) بیشترین ضریب تبیین را به‌عنوان نشانگر سرگروه به خود اختصاص دادند. مقدار قابل‌توجهی از تغییرات مورفولوژیکی با استفاده از آغازگرISSR22 با بالاترین محتوای چندشکلی (PIC) ۴۹/۰ ، تعداد آللهای مؤثر ۸۸/۱، شاخص تنوع ژنی نی ۴۶/۰ و شاخص شانون ۶۶/۰ توجیه شد. شاخص نشانگری در محدوده ۴۷/۵ الی ۵۰/۰ متغیر بود. این نتایج گویای آن است که از نشانگرهایی که پیوستگی بالایی با صفات مورفولوژیک دارند، می‌توان در شناسایی نشانگرهای مولکولی پیوسته با صفات ژنوتیپهای برنج به‌خصوص در شرایط تنش آبی بهره گرفت.

واژه‌های کلیدی: برنج، تجزیه ارتباط، صفات مورفولوژیک، ISSR، نشانگرهای مولکولی

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۱۷۳۳۲۲۸۸۸۳، پست الکترونیکی: hos.sabouri@gmail.com

مقدمه

برنج بعد از گندم مهمترین غله به شمار می‌رود و غذای اصلی بیش از نیمی از مردم دنیا را به خود اختصاص می‌دهد. بیش از ۸۰ درصد کالری و ۷۵ درصد پروتئین مصرفی آسیا از برنج تأمین می‌شود. برنج یکی از غذاهای اصلی و مهم مردم ایران می‌باشد و مصرف سرانه آن به ۳۸ کیلوگرم در سال می‌رسد (۱۴). برنج گیاهی است نیمه آبزی و تا زمان رسیدن به ۸ – ۲۰ هزار مترمکعب در هکتار آب احتیاج دارد (۲۷). با توجه به نیاز آبی بالای برنج، آب یکی از منابع مهم محدودکننده در تولید محصول برنج می‌باشد (۲۵). لذا معرفی ژنوتیپهایی از برنج که تحت شرایط با منابع محدود آبی قادر به رشد باشند ضروری به نظر می‌رسد. با توجه به تأثیر شرایط نامساعد محیطی و موقعیت اقلیمی حاکم بر کشور ایران بر رشد گیاهان، خشکی هنوز عمده‌ترین محدودیت در تولید محصولات زراعی محسوب می‌شود، به گونه‌ایی که از بین تنشهای زنده و غیرزنده، خشکی به‌تنهایی مسبب ۴۵ درصد از کاهش

عملکرد محصولات زراعی می‌باشد. لذا شناسایی صفات مرتبط با تحمل به خشکی می‌تواند در گزینش ژنوتیپهای سازگار، کمک‌کننده و یاری‌رسان باشد (۳). ازآنجایی‌که تنوع ژنتیکی در سازگاری و بقای گیاهان در برابر تغییرات محیطی نقش مهمی ایفاء می‌کند، بنابراین آگاهی از تنوع ژنتیکی درون و بین جمعیتهای گیاهی دارای اهمیت ویژه‌ای است (۱۷ و ۲۸). روشهای مختلفی برای بررسی تنوع ژنوتیپی وجود دارد و در بین این روشها، بررسی تنوع به کمک نشانگرهای مولکولی که چندشکلی را در سطح DNA آشکار می‌کنند (۲۱) و در نتیجه تحت تأثیر شرایط محیطی یا مراحل تکوینی گیاه قرار نمی‌گیرند، اهمیت ویژه‌ای دارد. از نشانگرهای مولکولی کارآمد می‌توان به ISSR (Inter Sequence Specific Repeat) و نشانگرهای مبتنی بر رتروترانسپوزون‌ها ازجمله (Inter-Retro IRAP (transposon Amplified Polymorphism و (inter iPBS (Primer Binding Site Amplification اشاره نمود که به دلیل پوشش ژنومی بالا، تکرارپذیری زیاد و چندشکلی بالا برای بررسی تنوع ژنتیکی، تهیه نقشه‌های ژنتیکی، تجزیه و تحلیل شجره‌ها و تجزیه ارتباط صفات مختلف مورد استفاده قرار می‌گیرند (۱۰ و ۱۳). تحمل به خشکی یک صفت پیچیده و کمی است و روش اندازه‌گیری مستقیمی برای اندازه‌گیری آن وجود ندارد و این امر باعث مشکل شدن شناسایی ژنوتیپهای متحمل به خشکی می‌شود (۷). در روشهای مولکولی مثل مکان‌یابی ارتباطی از عدم تعادل پیوستگی بین مکانهای ژنومی برای شناسایی و مکان‌یابی جایگاه صفات کمی استفاده می‌شود. در یک تحقیق، تجزیه ارتباط ۱۲۸ ژنوتیپ برنج و ۱۱ صفت زراعی در طول دو سال مورد مطالعه قرار گرفت. این بررسی با استفاده از ۱۲۵ نشانگر ریز ماهواره که سراسر ژنوم را پوشش می‌داد، انجام شد. در کل ۱۶ نشانگر، ارتباط معنی‌داری با صفتهای مختلف نشان دادند. این محققین بیان داشتند که استفاده از تجزیه ارتباط برای بررسی ژنوتیپهای مختلف برنج در روند برنامه‌های اصلاحی مفید و کارآمد است (۱۴). بررسی ارتباط بین ۳۸ ژنوتیپ با ۱۴ نشانگر مولکولی SSR نشان داده است که مکانهای ریز ماهواره RM434، RM104، RM257، RM262 با اکثر صفات مورد بررسی در ارتباط هستند (۱۱). این محققین بیان داشتند که تجزیه ارتباط می‌تواند به‌عنوان ابزاری قدرتمند در شناسایی نشانگرهای آگاهی‌بخش در برنامه‌های اصلاحی مورداستفاده قرار گیرد. با مطالعه گیاهچه‌های ۲۲ ژنوتیپ برنج در دو شرایط بدون تنش و تنش خشکی درمجموع ۱۶ نشانگر ریز ماهواره آگاهی‌بخش در دو شرایط شناسایی شده است (۴). در بررسی که به کمک ۸ نشانگر ISSR، IRAP و iPBS بر روی ۶۰ ژنوتیپ گندم صورت پذیرفته است ۵ آغازگر چندشکلی مناسبی داشته و از ۶۱ باند تولیدشده ۴۷ باند چند شکل، ۰۵/۷۷ درصد از باندها چند شکل، میانگین چندشکلی ۶۰/۷۲ درصد و تعداد آللهای چند شکل به‌طور متوسط ۸۷/۵ آلل بوده است. محتوای اطلاعات چند شکل نیز بین ۳۱/۰ تا ۴۱/۰ متغیر بوده و میانگین آن ۳۶/۰ به ازای هر نشانگر بوده است بیشترین و کمترین درصد چندشکلی مربوط به آغازگر ISSR و iPBS بوده که به ترتیب ۱۰۰ و ۵۰ درصد است این محققین عنوان می‌نمایند که مجموعه نشانگرهای ISSR،IRAP و iPBS استفاده‌شده برای شناسایی، تمایز، ارزیابی تنوع و روابط ژنتیکی جمعیتهای گندم مورد بررسی سودمند بوده و می‌تواند برای مدیریت ذخایر ژنی از طریق شناسایی نمونه‌های تکراری و همنام مفید باشد (۱۲). ازآنجاکه انتخاب به کمک نشانگر، یکی از مهمترین کاربردهای نشانگرهای مولکولی به‌ویژه در راستای ایجاد ژنوتیپهای متحمل به تنشهای محیطی می‌باشد، پژوهش حاضر با هدف بررسی تنوع ژنتیکی و شناسایی نشانگرهای مثبت و آگاهی‌بخش مرتبط با برخی صفات مورفولوژیک برنج در شرایط تنش خشکی و بدون تنش با استفاده از یک ژرم پلاسم بزرگ برنج و روش تجزیه ارتباط طرح‌ریزی شد.

مواد و روشها

مواد گیاهی پژوهش حاضر شامل تعداد ۱۱۲ لاین برنج تهیه شده از مؤسسه بین‌المللی تحقیقات برنج (International Rice Research Institute: IRRI) در قالب طرح بین‌المللی مشترک بین آن مؤسسه و دانشگاه گنبدکاووس بود (جدول ۱).

جدول ۱- شماره و نام ژنوتیپهای ارزیابی‌شده در این مطالعه.

شماره	نام ژنوتیپ	منشأ	شماره	نام ژنوتیپ	منشأ	شماره	نام ژنوتیپ	منشأ	شماره	نام ژنوتیپ	منشأ
7	BP 12600F-KN-4-1	INDONESIA	96	HHZ 1-DT3-Y1-Y1	IRRI	163	IR12L357	IRRI	281	IR 11A506	IRRI
8	BP 12816F-KN-7-1	INDONESIA	97	HHZ 1-DT4-LI1-LI1	IRRI	164	IR12L369	IRRI	282	IR 11A511	IRRI
9	BP 16732E-6	INDONESIA	98	HHZ 1-DT7-LI2-LI1	IRRI	165	IR13L114	IRRI	286	IR 11N121	IRRI
10	HHZ 10-DT7-Y1	IRRI	100	HHZ 21-SAL13-Y1-Y1	IRRI	166	IR13L118	IRRI	288	IR 11N169	IRRI
12	HHZ 14-SAL13-LI2-DT1	IRRI	101	HHZ 21-Y4-Y2-Y1	IRRI	167	IR13L137	IRRI	290	IR 11N313	IRRI
14	HHZ 1-DT3-Y1-Y1	IRRI	106	HHZ 2-SUB2-DT1-DT1	IRRI	171	IR13L397	IRRI	291	IR12L201	IRRI
15	GhNa-3		107	HHZ 3-SAL13-Y1-SAL1	IRRI	172	IR13L400	IRRI	292	SAKHA 105	EGYPT
52	IR 64683-87-2-2-3-3 (PSB RC 82)	PHILIPPINES	110	HHZ 3-SAL6-Y1-Y1	IRRI	173	IR13L406	IRRI	299	IR 11C123	IRRI
56	HHZ 10-DT5-LI1-LI1	IRRI	111	HHZ 4-DT3-Y1-Y1	IRRI	174	IR13L413	IRRI	300	IR 11C186	IRRI
60	HHZ 15-SAL13-Y1	IRRI	112	HHZ 4-DT6-LI2-LI1	IRRI	175	IR14L177	IRRI	307	IR 11C228	IRRI
61	HHZ 15-SAL13-Y3	IRRI	116	HHZ 6-DT1-LI1-LI1	IRRI	177	IR14L238	IRRI	309	HHZ-5-DT20-DT2-DT1	IRRI
63	HHZ 18-Y3-Y1-Y1	IRRI	121	IR14L116	IRRI	178	IR14L240	IRRI	311	Firooz (Acc 39261)	IRAN
64	HHZ 1-DT3-Y1-Y1	IRRI	122	IR14L101	IRRI	180	IR 43	IRRI	312	IR64197-3B-15-2	IRRI
66	HHZ 1-DT7-LI2-LI1	IRRI	123	IR14L103	IRRI	191	IR14T111	IRRI			
67	HHZ 21-DT7-Y1-Y1	IRRI	124	IR13L188	IRRI	197	IR14T129	IRRI			
68	HHZ 21-SAL13-Y1-Y1	IRRI	125	IR14L247	IRRI	215	IR12T246	IRRI			
69	HHZ 21-Y4-Y2-Y1	IRRI	127	IR14L260	IRRI	216	IR11T257	IRRI			
70	HHZ 22-Y3-DT1-Y1	IRRI	128	IR14L256	IRRI	222	IR 28	IRRI			
71	HHZ 23-DT16-DT1-DT1	IRRI	129	IR14L248	IRRI	228	IR71896-3R-8-3-1				
73	HHZ 26-SAL12-Y1-Y1	IRRI	131	IR14L121	IRRI	237	IRBL7-M[CO]	IRRI			
74	HHZ 2-SUB2-DT1-DT1	IRRI	132	IR14L153	IRRI	256	IRBLZT-IR56[CO]	IRRI			
76	HHZ 3-SAL13-Y2-DT1	IRRI	133	IR14L160	IRRI	260	IR06A145	IRRI			
77	HHZ 3-SAL4-Y1-Y1	IRRI	134	IR14L137	IRRI	261	IR 09L204	IRRI			
83	HHZ 4-SAL5-Y2-Y1	IRRI	135	IR13L268	IRRI	262	IR08L216	IRRI			
84	HHZ 6-DT1-LI1-LI1	IRRI	138	IR12L380	IRRI	266	IR09N516	IRRI			
85	IRRI 104	IRRI	140	IR14L262	IRRI	267	IR 09N251	IRRI			
87	IRRI 154	IRRI	141	IR14L271	IRRI	268	IR 10A227	IRRI			
88	HHZ 10-DT5-LI1-LI1	IRRI	143	IR14L270	IRRI	269	IR10A121	IRRI			
89	HHZ 10-DT8-DT1-DT1	IRRI	146	IR13F228	IRRI	270	IR 10A199	IRRI			
91	HHZ 15-DT7-SAL2	IRRI	150	IR13F321	IRRI	272	IR 10A237	IRRI			
92	HHZ 15-SAL13-Y1	IRRI	153	IR13F589	IRRI	273	IR 10A314	IRRI			

93	HHZ 15-SAL13-Y3	IRRI	156	IRRI 132	IRRI	278	IR 11A479	IRRI
95	HHZ 18-Y3-Y1-Y1	IRRI	160	B11598C-TB-2-1-B-7	INDONESIA	280	IR 11A501	IRRI

لاینهای مذکور در دو آزمایش جداگانه در قالب طرح لاتیس در دو شرایط نرمال و تنش خشکی در سه تکرار ارزیابی شدند. ابتدا لاینهای مذکور در گلدانهایی کشت شدند و بعد به زمین اصلی منتقل گشتند و نشاکاری انجام شد. به‌منظور ارزیابی خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک نمونه‌گیری از خاک مزرعه انجام شد و به آزمایشگاه خاک‌شناسی شهرستان کلاله منتقل گردید (جدول ۲). هرکدام از ۱۱۲ لاین با فاصله بین و روی ردیف ۲۵ سانتیمتر در مساحت ۲ متر و ۲۵ سانتی‌متر مربع کشت شدند. آبیاری در شرایط بدون تنش به‌صورت غرقاب در طول دوره رشد ژنوتیپها انجام شد، اما در محیط تنش آبیاری مزرعه از ۴۰ روز پس از نشاکاری (مرحله با حداکثر پنجه‌زنی) به‌منظور اعمال تنش، آبیاری قطع شد و بعد از ۴۰ روز به فاصله ۱۵ روز آبیاری انجام گردید. پس از ۱۵ روز از خاک مزرعه نمونه‌برداری شد و وزن خشک و تر آن تعیین گردید و رطوبت وزنی آن اندازه‌گیری شد و با توجه به منحنی رطوبتی خاک مزرعه برحسب بار تخمین زده شد که در مرحله اول پتانسیل آب خاک مزرعه ۱۵ بار و در مرحله دوم پتانسیل آب خاک ۲۵ بار بود. برای جلوگیری از نفوذ آب از حاشیه مزرعه، فاصله بین آزمایشها دو متر در نظر گرفته شد و از پوشش پلاستیکی برای ممانعت از نفوذ آب استفاده گردید. از ۴۹ بوته موجود، بعد از رسیدگی کامل ۱۰ بوته از هر لاین با رعایت اثر حاشیه برداشت شد و برای اندازه‌گیری صفات به آزمایشگاه منتقل گردید و ۲۳ صفت مورفولوژیک؛ تعداد روز از کشت تا گلدهی، بیوماس، ارتفاع گیاه، تعداد پنجه بارور، تعداد پنجه کل، طول و عرض برگ پرچم، طول خروج از غلاف، قطر ساقه، طول خوشه اصلی، وزن کل خوشه‌ها، وزن خوشه اصلی، وزن کل ساقه، وزن دانه‌های پر، وزن دانه‌های پوک، تعداد دانه پر، تعداد دانه پوک، تعداد خوشه چه اولیه، تعداد خوشه چه ثانویه؛ بر اساس دستورالعمل استاندارد ارزیابی صفات برنج (SES,2013) اندازه‌گیری و ثبت گردیدند.

جدول ۲- خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک محل آزمایش.

مشخصه (Characteristic)		مقدار (content)
هدایت الکتریکی (دسی زیمنس بر متر)	Electric conductivity (dc Siemens / m)	۲
pH		۶/۷
مواد خنثی شونده (درصد)	Neutralizing agents (percent)	۵/۱۰
کربن آلی (درصد)	Organic carbon (percent)	۸۴/۰
نیتروژن کل (درصد)	Total nitrogen (percent)	۰۸/۰
فسفر قابل‌جذب (قسمت در میلیون)	absorbable Phosphorus (ppm)	۴/۱۶
پتاسیم قابل‌جذب (قسمت در میلیون)	absorbable potassium (ppm)	۱۹۵
سیلت (درصد)	Si (percent)	۳۵
رس (درصد)	C (percent)	۵۴
لؤم	L (percent)	۱۱
درصد رطوبت اشباع	Saturated moisture percent	۵/۴۸
آهن	Fe	۴
منگنز	Mn	۸/۱۷
روی	Zn	۷/۰
مس	Cu	۲

استخراج DNA و انجام PCR: از برگهای تازه و جوان ژنوتیپها، نمونه‌های برگی به‌منظور استخراج DNA به روش CTAB استفاده شد (۲۹). پس از استخراج DNA کیفیت و کمیت تقریبی آن به‌وسیله ژل آگارز ۸/۰ درصد تعیین شد. این آزمایش با استفاده از ۳۰ آغازگر ISSR، IRAP و iPBS ژنوم گیاه برنج انجام شد. این نشانگرها طبق مطالعات پیشین با استفاده از جمعیتها و زمینه‌های ژنتیکی متعدد، پیوسته با QTLهای مرتبط با تنش خشکی در گیاه برنج شناسایی‌شده بودند. برای انتخاب این نشانگرها از مقالات استفاده شد (۱۸ و ۱۹). اطلاعات مرتبط با این نشانگرها در جدول ۳ ارائه‌شده است.

جدول ۳- اطلاعات مربوط به نشانگرهای مورداستفاده در این مطالعه.

نشانگر	توالی	دمای آنیلینگ (درجه سانتی‌گراد)
ISSR1	5`AACAACAACAACAACAACG-3`	۴۳-۴۸
iPBS2238	5`-ACCTAGCTCATGATGCCA-3`	۵۵-۶۰
iPBS2085	5`-ATGCCGATACCA-3`	۵۲-۵۷
ISSR7	5`ACACACACACACACACC-3`	۵۰-۵۵
iPBS2239	5`-ACCTAGGCTCGGATGCCA-3`	۵۵-۶۰
iPBS2221	5`-ACCTAGCTCACGATGCCA-3`	۵۰-۵۵
iPBS2081	5`-GCAACGGCGCCA-3`	۵۰-۵۵
iPBS2224	5`-ATCCTGGCAATGGAACCA-3`	۵۰-۵۵
ISSR13	5`-GACAGAGAGAGAGAGAA-3`	۵۰-۵۵
ISSR14	5`-CACACACACACACACAA-3`	۵۰-۵۵
ISSR16	5`-CTCTCTCTCTCTCTCTG-3`	۵۰-۵۵
ISSR21	5`-ACAGACAGACAGACAGACAGC-3`	۵۰-۵۵
ISSR22	5`-CTCTCTCTCTCTCTCTT-3`	۵۰-۵۵
iPBS2231	5`-ACTTGGATGCTGATACCA-3`	۵۰-۵۵
iPBS2074	5`-GCTCTGATACCA-3`	۵۰-۵۵
ISSR29	5`-TCTCTCTCTCTCTCTCA-3`	۵۴-۵۹
ISSR30	5`-GAGGAGAGAGAGAGAGG-3`	۵۹-۶۴
ISSR31	5`-GAAGAGAGAGAGAGAT-3`	۵۵-۵۰
iPBS2076	5`-GCTCCGATGCCA-3`	۵۹-۶۴
IRAP33	5`-CTTGCTGGAAAGTGTGTGAGAGG-3`	۶۲-۶۷
iPBS2077	5`-CTCACGATGCCA-3`	۵۵-۶۰
ISSR43	5`-AGAGAGAGAGAGAGAGC-3`	۵۵-۵۰
iPBS2083	5`-CTTCTAGCGCCA-3`	۵۵-۵۰
ISSR45	5`-GTCGTCGTCGTCGTCGTCA-3`	۵۵-۵۰
ISSR46	5`-GTTGTTGTTGTTGTTGTTA-3`	۴۲-۴۷
ISSR47	5`-CTCCTCCTCCTCCTCCTCG-3`	۵۵-۶۰
iPBS2242	5`-GCCCCATGGTGGGCGCCA-3`	۵۰-۵۵
iPBS2237+iPBS2240	5`-CCCCTACCTGGCGTGCCA-3`/5`-AACCTGGCTCAGATGCCA-3`	۵۵-۶۰
iPBS2239+iPBS2240	5`-ACCTAGGCTCGGATGCCA-3`/5`-AACCTGGCTCAGATGCCA-3`	۵۵-۶۰
iPBS2077+iPBS2239	5`-CTCACGATGCCA-3`/5`-ACCTAGGCTCGGATGCCA-3`	۵۵-۶۰

رقیق‌سازیDNA در حجم ۱۰ میکرولیتر، با اجزای ۲ میکرولیتر DNA، ۱ میکرولیتر از بافر PCR(10X)، ۴/۰ میکرولیتر از هر آغازگر با غلظت ۶۰ نانوگرم در میکرولیتر، ۶/۰ میکرولیتر مخلوط dNTP (۲ میلی مولار)، ۱۲/۰ میکرولیتر آنزیم Taq polymerase DNA (۵ واحد در میکرولیتر) و ۵ میکرولیتر آب دیونیزه شده انجام شد. واکنش PCR به‌صورت تاچ داون و توسط دستگاه ترموسایکلر Bio-Rad iCycler m100 (ساخت کشور آمریکا) صورت گرفت. چرخه حرارتی شامل یک چرخه واسرشت اولیه برای DNA الگو در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴ دقیقه و به دنبال آن ۱۰ چرخه شامل ۴۵ ثانیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، ۴۵ ثانیه در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد (با کاهش هر یک درجه سانتی‌گراد در هر چرخه تا رسیدن به دمای اتصال) و یک دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد و به دنبال آن ۲۶ چرخه شامل ۴۵ ثانیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، ۴۵ ثانیه در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد و یک دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد بود. پس از اتمام ۲۶ چرخه فوق، نمونه‌ها به‌منظور انجام بسط نهایی پنج دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. سپس فرآورده‌های PCR با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز ۵/۱ درصد تفکیک شدند و پس از رنگ‌آمیزی با safe staining توسط اشعه ماوراءبنفش ملاحظه و عکس‌برداری شدند. در نهایت امتیازدهی نوارها انجام گرفت. به‌منظور تجزیه و تحلیل داده‌های مولکولی و به دست آوردن اطلاعات مربوط به تنوع نشانگرهای مورد بررسی از نرم‌افزار POP gene v1.32، برای تجزیه به مؤلفه‌های اصلی از نرم‌افزار PAST v3.21 و رسم نمودار درختی و سایر اطلاعات تنوع ژنتیکی از نرم‌افزار Power marker v3.0 استفاده شد. شاخص اطلاعات چندشکلی آغازگر از طریق فرمول $PIC= \Sigma (1- pi^2)/n$ محاسبه شد که pi فراوانی آلل i ام و n تعداد کل ژنوتیپها می‌باشد. شاخص نشانگر از حاصل‌ضرب تعداد نوارهای چند شکل در شاخص محتوای چندشکلی محاسبه شد (۲۶). به منظور گروه‌بندی ژنوتیپهای مورد بررسی از تجزیه به مؤلفه‌های اصلی استفاده شد. برای این منظور از نرم افزار PAST v3.21 استفاده شد. تجزیه رگرسیون چندگانه به روش گام‌به‌گام برای ۲۳ صفت مورفولوژیک به کمک نرم‌افزار SPSS Ver. 20 انجام شد و سپس با استفاده از رگرسیون مرحله‌ای نشانگرهای تأثیرگذار برای هر صفت مشخص شد.

نتایج

نتایج حاصل از نشانگرهای مولکولی در ۱۱۲ ژنوتیپ مورد مطالعه: ۳۰ آغازگر مورد استفاده الگوی نواربندی مناسب و قابل امتیازدهی تولید نمودند (جدول ۴). این آغازگرها درمجموع ۲۸۹ باند با میانگین ۶۳/۹ باند به ازای هر آغازگر تولید نمودند؛ که از این میان ۲۱۸ باند چند شکل، و ۷۱ باند یک‌شکل با میانگین ۲۷/۷ باند چند شکل به ازای هر آغازگر بودند. درصد چندشکلی از ۵۰/۸۷ برای آغازگر ISSR11 تا ۱۴/۵۷ درصد برای آغازگر ترکیبی iPBS2077+iPBS2239 متغیر بود و میانگین آن برای همه آغازگرها ۳۳/۷۵ درصد بود. توزیع مقدار PIC برای آغازگرهای مورداستفاده در محدوده ۴۹/۰ برای ISSR22 الی ۰۶۲/۰ برای iPBS2237+iPBS2240 با میانگین ۳۶/۰ قرار داشت. شاخص نشانگر نیز از ۴۷/۵ تا ۵۰/۰ با میانگین ۵۷/۲ متغیر بود. تعداد آللهای مؤثر (۱۶) بین ۸۸/۱ (ISSR22) تا ۰۸/۱ (iPBS2237+iPBS2240) متغیر بود و میانگین آن ۴۵/۱ برای همه نشانگرها به دست آمد. بررسی تنوع ژنتیکی بر اساس شاخص تنوع ژنی نی (۲۰و۲۴) و شاخص اطلاعات شانون (۱۷) نشان داد که شاخص تنوع ژنی نی در آغازگر ISSR22 برابر ۴۶/۰ و کمترین مقدار آن در نشانگر iPBS2237+iPBS2240 برابر ۰۴۹/۰ متغیر بود و میانگین آن در همه نشانگرهای موردبررسی ۲۶/۰ بود.

جدول ۴- اطلاعات مربوط به چندشکلی نشانگرها در این بررسی

نشانگر	تعداد کل باندها	تعداد باند چند شکل	PIC	شاخص نشانگر	درصد چندشکلی	تعداد آللهای مؤثر	تنوع ژنی نی	شاخص اطلاعات شانون
ISSR1	۷	۵	۳۷/۰	۸۶/۱	۴۳/۷۱	۵۶/۱	۳۳/۰	۴۹/۰
iPBS2238	۱۰	۷	۴۵/۰	۱۵/۳	۷۰	۴۷/۱	۲۵/۰	۳۷/۰
iPBS2085	۷	۶	۴۵/۰	۷۳/۲	۷۱/۸۵	۷۶/۱	۴۱/۰	۶۰/۰
ISSR7	۱۰	۷	۳۱/۰	۱۴/۲	۷۰	۳۵/۱	۲۱/۰	۳۲/۰
iPBS2239	۱۴	۱۲	۴۶/۰	۴۷/۵	۷۱/۸۵	۵۶/۱	۳۲/۰	۴۹/۰
iPBS2221	۹	۷	۳۱/۰	۱۷/۲	۷۸/۷۷	۴۴/۱	۲۷/۰	۴۳/۰
iPBS2081	۸	۷	۴۷/۰	۳۲/۳	۵/۸۷	۶۰/۱	۳۴/۰	۵۰/۰
iPBS2224	۱۱	۹	۳۳/۰	۹۸/۲	۸۲/۸۱	۳۰/۱	۲۰/۰	۳۳/۰
ISSR13	۸	۶	۴۳/۰	۵۶/۲	۷۵	۶۸/۱	۳۶/۰	۵۱/۰
ISSR14	۸	۶	۱۵/۰	۹۱/۰	۷۵	۲۰/۱	۱۳/۰	۲۱/۰
ISSR16	۹	۶	۲۸/۰	۶۵/۱	۶۷/۶۶	۳۸/۱	۲۵/۰	۳۸/۰
ISSR21	۹	۷	۴۵/۰	۱۵/۳	۷۸/۷۷	۶۰/۱	۳۳/۰	۴۹/۰
ISSR22	۹	۶	۴۹/۰	۹۶/۲	۶۷/۶۶	۸۸/۱	۴۶/۰	۶۶/۰
iPBS2231	۱۲	۹	۴۳/۰	۸۶/۳	۷۵	۳۶/۱	۲۳/۰	۳۵/۰
iPBS2074	۱۰	۷	۴۵/۰	۱۴/۳	۷۰	۵۴/۱	۳۱/۰	۴۷/۰
ISSR29	۷	۶	۴۷/۰	۸۴/۲	۷۱/۸۵	۷۰/۱	۳۹/۰	۵۷/۰
ISSR30	۹	۷	۱۲/۰	۸۱/۰	۷۸/۷۷	۱۴/۱	۰۹/۰	۱۵/۰
ISSR31	۱۱	۹	۳۵/۰	۱۵/۳	۸۲/۸۱	۳۲/۱	۱۹/۰	۳۰/۰
iPBS2076	۱۲	۹	۴۵/۰	۰۸/۴	۷۵	۷۱/۱	۳۹/۰	۵۷/۰
IRAP33	۱۰	۷	۴۴/۰	۱/۳	۷۰	۳۵/۱	۲۶/۰	۴۳/۰
iPBS2077	۱۱	۸	۲۴/۰	۹۲/۱	۷۳/۷۲	۲۲/۱	۱۶/۰	۲۹/۰
ISSR43	۱۰	۸	۲۶/۰	۰۶/۲	۸۰	۲۲/۱	۱۲/۰	۱۹/۰
iPBS2083	۱۲	۹	۲۱/۰	۸۵/۱	۷۵	۲۹/۱	۱۷/۰	۲۶/۰
ISSR45	۱۰	۷	۴۰/۰	۸۱/۲	۷۰	۵۰/۱	۳۲/۰	۵۰/۰
ISSR46	۷	۶	۴۰/۰	۴۳/۲	۷۱/۸۵	۴۱/۱	۲۴/۰	۳۶/۰
ISSR47	۱۳	۱۱	۳۰/۰	۳۰/۳	۶۲/۸۴	۴۶/۱	۲۷/۰	۴۱/۰
iPBS2242	۹	۶	۳۰/۰	۸۲/۱	۶۷/۶۶	۴۳/۱	۲۹/۰	۴۷/۰
iPBS2237+iPBS2240	۱۲	۸	۰۶/۰	۵۰/۰	۶۷/۶۶	۰۸/۱	۰۵/۰	۰۸/۰
iPBS2239+iPBS2240	۷	۴	۴۴/۰	۷۸/۱	۱۴/۵۷	۳۰/۱	۲۰/۰	۳۴/۰
iPBS2077+iPBS2239	۸	۶	۴۵/۰	۷۲/۲	۷۵	۶۴/۱	۳۸/۰	۵۷/۰
میانگین	۶۳/۹	۲۷/۷	۳۶/۰	۵۷/۲	۳۳/۷۵	۴۵/۱	۲۶/۰	۴۰/۰

میانگین شاخص شانون در همه نشانگرها ۴۰/۰ بود. بیشترین میزان این شاخص ۶۶/۰ در آغازگر ISSR22 و کمترین مقدار آن ۰۸/۰ در آغازگر iPBS2237+iPBS2240 مشاهده گردید.

تجزیه به مؤلفه‌های اصلی: به‌منظور تعیین میزان همبستگی بین صفات و توجیه مقادیر واریانس متغیرهای اولیه چند مؤلفه اصلی اول، تجزیه به مؤلفه‌های اصلی انجام شد. در کل ۱۱۱ مؤلفه تغییرات را توجیه نمود که از این میان

بیشترین توجیه مربوط به ۱۰ مؤلفه اول و به خصوص مؤلفه اولین بود(جدول ۵).

جدول ۵- اطلاعات مربوط به ۱۰ مؤلفه اول در ژنوتیپهای برنج مورد ارزیابی

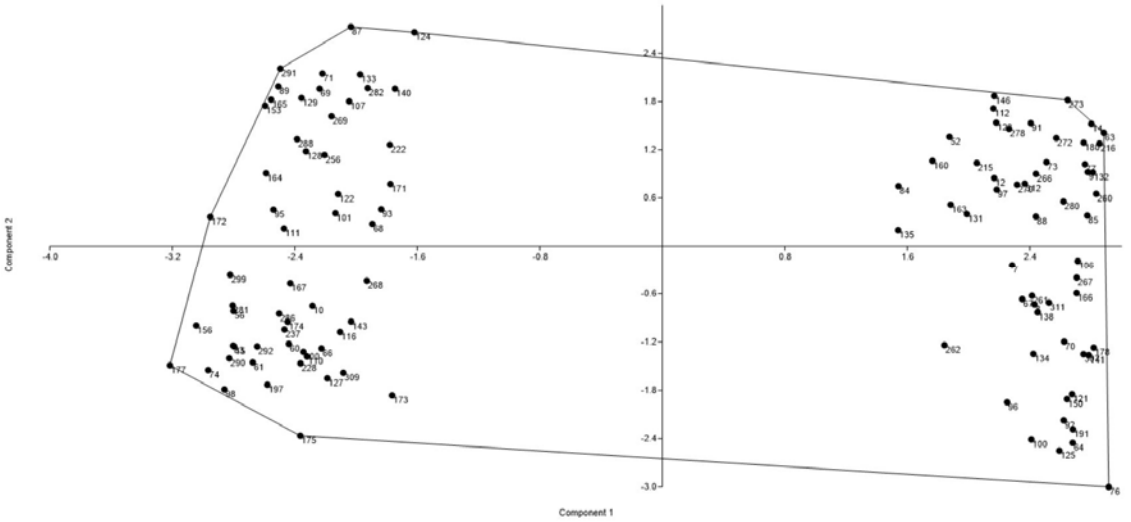
مؤلفه اصلی	مقدار ویژه	درصد واریانس	میزان کل
۱	۹۶/۵	۲۵/۲۱	۲۵/۲۱
۲	۹۸/۱	۰۷/۷	۳۲/۲۸
۳	۲۸/۱	۵۵/۴	۸۷/۳۲
۴	۰۵/۱	۷۶/۳	۶۳/۳۶
۵	۹۹۶/۰	۵۵/۳	۱۸/۴۰
۶	۸۰/۰	۸۵/۲	۰۳/۴۳
۷	۷۶/۰	۶۹/۲	۷۳/۴۵
۸	۷۴/۰	۶۳/۲	۳۵/۴۸
۹	۶۵/۰	۳۱/۲	۶۷/۵۰
۱۰	۶۰/۰	۱۴/۲	۸۱/۵۲

اولین مؤلفه ۵۰/۲۱ درصد تغییرات را توجیه نمود دومین مؤلفه ۰۷/۷ درصد از تغییراتی را که توسط مؤلفه اول توجیه نشده بود را توجیه کرد و به همین ترتیب روند توجیه تغییرات ادامه یافت تا اینکه مؤلفه دهم ۱۴/۲ درصد از تغییراتی را که توسط ۹ مؤلفه قبل توجیه نشده بود را توجیه نمود و در کل ده مؤلفه اول ۸۱/۵۲ درصد تغییرات را توجیه نمودند. تجزیه به مؤلفه‌های اصلی ژنوتیپهای برنج مورد بررسی را به ۴ گروه تقسیم‌بندی نمود (جدول ۶ و شکل ۱). گروه اول مؤلفه اول و دوم بالا، گروه دوم مؤلفه اول بالا و مؤلفه دوم پایین، گروه سوم مؤلفه اول پایین و مؤلفه دوم بالا و نهایتاً گروه چهارم در هر دو مؤلفه دارای ارزشهای پایینی بودند. بررسیهای صفات مرفوفنولوژیک بین گروهها نشان داد که در شرایط بدون تنش گروه اول قطر ساقه، تعداد خوشچه اصلی و شاخص برداشت بالاتری در مقایسه با سه گروه دیگر داشتند. این گروه در شرایط تنش خشکی تعداد پنجه بارور، تعداد پنجه کل و شاخص برداشت بالاتری دارا بودند. گروه دوم در شرایط بدون تنش طول برگ پرچم، طول خروج از غلاف و باروری بیشتری داشتند در شرایط تنش خشکی این گروه از نظر خصوصیاتی مثل طول برگ پرچم، طول خروج از غلاف بالاتر بودند.

جدول ۶- گروه بندی ژنوتیپهای برنج بر اساس تجزیه به مؤلفه های اصلی و شماره ژنوتیپهای هر گروه

گروه ۱	گروه ۲	گروه ۳	گروه ۴
۲۷۳	۸۷	۲۹۹	۷
۱۴	۱۲۴	۱۶۷	۱۰۶
۶۳	۲۹۱	۲۶۸	۲۶۷
۲۱۶	۷۱	۲۸۱	۱۶۶
۱۸۰	۱۳۳	۵۶	۶۷
۲۷۲	۸۹	۲۸۶	۲۶۱
۹۱	۶۹	۱۰	۸
۱۱۲	۲۸۲	۱۴۳	۳۱۱
۱۴۶	۱۴۰	۱۵۶	۱۳۸
۱۲۳	۱۶۵	۲۳۷	۲۶۲
۲۷۸	۱۲۹	۱۱۶	۱۳۴
۵۲	۱۰۷	۸۳	۷۰
۷۳	۱۵۳	۱۵	۱۷۸
۷۷	۲۶۹	۲۹۲	۳۰۷
۹	۲۲۲	۶۰	۱۴۱
۱۳۲	۲۸۸	۶۶	۱۲۱
۲۶۰	۱۲۸	۲۹۰	۱۵۰
۲۶۶	۲۵۶	۶۱	۹۶
۲۱۵	۱۶۴	۳۰۰	۹۲
۱۶۰	۱۷۱	۱۱۰	۱۹۱
۱۲	۱۲۲	۲۲۸	۱۰۰
۹۷	۹۳	۱۷۷	۶۴
۲۷۰	۱۰۱	۷۴	۱۲۵
۳۱۲	۶۸	۹۸	۷۶
۲۸۰	۹۵	۱۹۷	
۸۵	۱۱۱	۱۲۷	
۸۸	۱۷۲	۳۰۹	
۱۳۱		۱۷۳	
۱۶۳		۱۷۵	
۸۴			
۱۳۵			

گروه سوم در شرایط بدون تنش از نظر خصوصیاتی مثل عرض برگ پرچم، مساحت برگ پرچم، طول خوشه اصلی، وزن کل خوشه‌ها، وزن خوشه اصلی، تعداد دانه پر، وزن دانه پر، تعداد خوشچه ثانویه، بیوماس و عملکرد برتر بودند، گروه سوم در شرایط تنش خشکی مساحت برگ پرچم، قطر ساقه، طول خوشه اصلی، وزن کل خوشه‌ها، وزن خوشه اصلی، وزن کل ساقه‌ها، تعداد دانه پر، وزن دانه پر، تعداد خوشچه اولیه، بیوماس و عملکرد بالاتری داشتند. گروه چهارم در شرایط بدون تنش تعداد پنجه بارور، تعداد پنجه کل، وزن کل ساقه‌ها، تعداد دانه پوک، وزن دانه پوک و روز تا گلدهی بالاتری دارا بودند در شرایط تنش خشکی گروه چهارم عرض برگ پرچم و تعداد خوشچه ثانویه بالاتری داشتند.

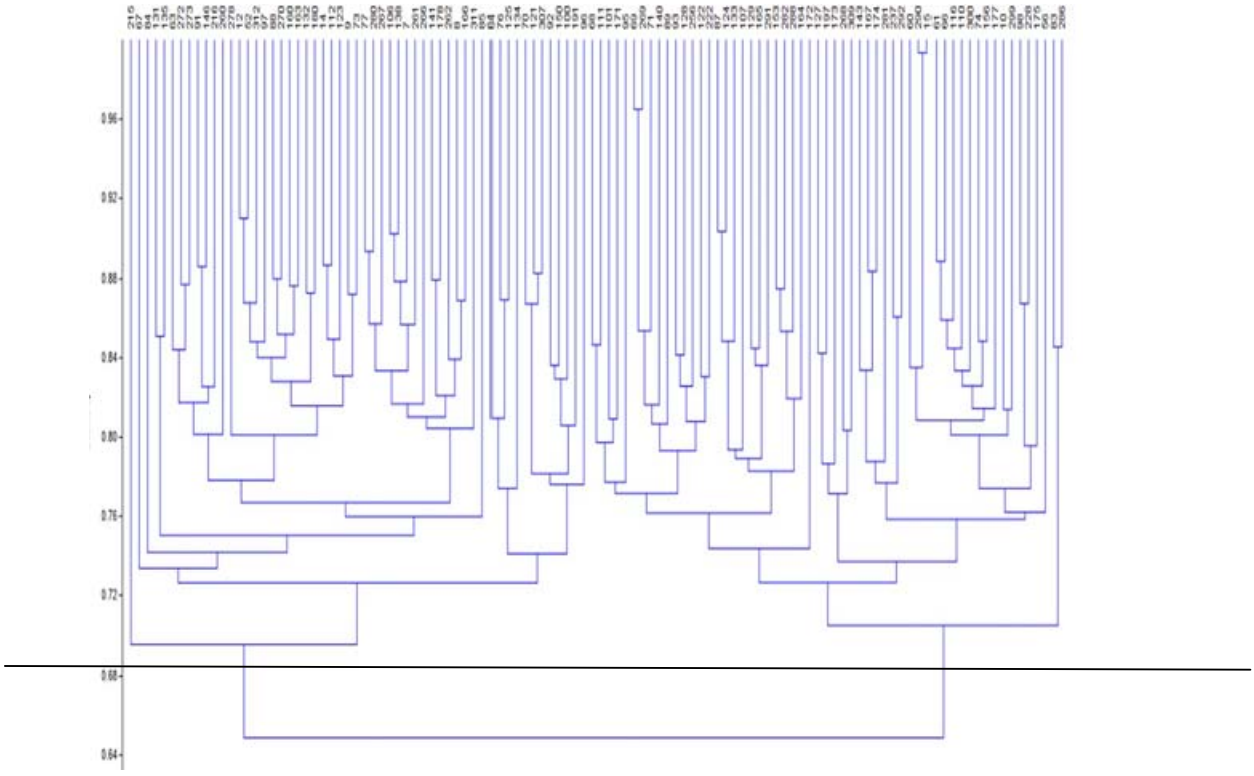


شکل ۱- پلات دوبعدی کلاسترها به کمک نشانگرهای ISSR، IRAP و iPBS.

رگرسیون داده‌های مولکولی و مورفولوژیکی: نتایج حاصل از تجزیه رگرسیون ۳۰ نشانگر ISSR، IRAP و iPBS ارتباط معنی‌دار میان ۱۳۷ نوع آلل در شرایط بدون تنش و ۱۲۰ نوع آلل در شرایط تنش خشکی را با صفات بررسی‌شده نشان داد. بیشترین تعداد آلل آگاهی‌بخش در شرایط بدون تنش مربوط به صفت طول برگ پرچم (۴۱ آلل) و کمترین تعداد آلل شناسایی‌شده در ارتباط با صفت عرض برگ پرچم بود. بیشترین و کمترین تعداد آلل آگاهی‌بخش در شرایط تنش خشکی به ترتیب مربوط به صفت وزن کل خوشه‌ها (۲۷ آلل) و صفت بیوماس (۴ آلل) بود. در نشانگرهای مورداستفاده ضریب تبیین در مجموع نشانگرهای آگاهی‌بخش در شرایط بدون تنش از ۹۸/۰ (صفت طول برگ پرچم) الی ۲۲/۰ (عرض برگ پرچم) متغیر بود. در ارتباط با عملکرد (۱۴ آلل)، وزن خوشه اصلی (۱۷ آلل) و وزن کل خوشه‌ها (۱۲ آلل) به ترتیب با ضرایب تبیین ۵۹۳/۰، ۷۰۵/۰ و ۶۵/۰ شناسایی شد. در شرایط تنش خشکی نیز بیشترین ضریب تبیین ۸۹/۰ درصد (وزن کل خوشه‌ها) و کمترین ضریب تبیین ۲۵/۰ (بیوماس) شناسایی شد. در شرایط تنش خشکی برای عملکرد (۷ آلل) و وزن خوشه اصلی (۱۸ آلل) با ضرایب ۴۴۷/۰ و ۷۶۳/۰ تبیین گردیدند (جدولهای ۷ و ۸).

تجزیه خوشه‌ای ژنوتیپها به کمک نشانگرهای مورداستفاده: پس از اینکه مناطق مورد نظر در ژنوم ژنوتیپهای مورد بررسی با استفاده از نشانگرهای ترانسپوزونی استفاده شده مورد تکثر قرار گرفت، ژنوتیپها با توجه به تکثیر یا عدم تکثیر منطقه مورد نظر در ژنوم به صورت صفر و یک (عدم وجود باند و وجود باند) تعیین ژنوتیپ شدند و داده‌های مولکولی حاصل برای گروه بندی

ژنوتیپها با استفاده از نرم افزار PAST مورد استفاده قرار گرفتند. گروه‌بندی ژنوتیپها با استفاده از نرم‌افزار PAST بر اساس داده‌های مولکولی با روش UPGMA و معیار ضریب کوفنینگ (۹۲/۰) موجب شد ژنوتیپها در ۷ گروه قرار گیرند (شکل ۲). بررسی صفات مرفوفنواوژیک بین گروهها نشان داد که گروه ۱ در هر دو شرایط برتری خاصی در هیچ یک از صفات نداشت گروه دوم در شرایط بدون تنش تعداد خوشچه ثانویه بیشتری داشت و در شرایط تنش خشکی در تعداد خوشچه ثانویه برتر بود. گروه سوم در شرایط بدون تنش تعداد پنجه بارور بیشتر و در شرایط تنش خشکی تعداد پنجه بارور و تعداد پنجه کل بیشتری داشت. گروه چهارم در شرایط بدون تنش وزن خوشه اصلی بیشتر و در شرایط تنش خشکی تعداد دانه پر، وزن دانه پر و تعداد خوشچه ثانویه بالاتری دارا بود. گروه پنجم در شرایط نرمال در صفت باروری برتر بود و در شرایط تنش خشکی برتری خاصی در هیچ کدام از صفات نداشت. گروه ششم در شرایط نرمال طول برگ پرچم، مساحت برگ پرچم، وزن کل خوشه‌ها، تعداد دانه پر، تعداد خوشچه اولیه، بیوماس و عملکرد بیشتری در مقایسه با گروههایی دیگر داشت این گروه در شرایط تنش خشکی طول برگ پرچم، مساحت برگ پرچم، قطر ساقه، وزن کل خوشه‌ها، وزن کل ساقه و عملکرد بالاتری دارا بود. گروه هفتم در شرایط بدون تنش قطر ساقه، طول خوشه اصلی و شاخص برداشت بیشتر و در شرایط تنش خشکی طول خوشه بیشتری داشت.



شکل ۲- دندروگرام تجزیه خوشه‌ای ژنوتیپهای برنج مورد بررسی به کمک نشانگرهای مولکولی.

جدول ۷- نتایج تجزیه ارتباط با استفاده از رگرسیون گام‌به‌گام برای داده‌های مولکولی و صفات مورفولوژیک در شرایط غرقاب در ژنوتیپهای برنج

صفت	نشانگر															R2 تصحیح شده	ضریب تبیین	سطح معنی‌داری
ارتفاع کل	iPBS 2076-7	iPBS 2231-3	iPBS 2081-1	ISSR 49-1	ISSR 7-6	ISSR1-3	iPBS 2238-7	iPBS2077-8	ISSR47-2	iPBS2085-5	IRAP33-3	iPBS2085-5	iPBS 2074-4	iPBS 2083-4		۷۰/۰	۷۵۲/۰	۰۲۲/۰
تعداد پنجه بارور	ISSR 30-1	iPBS 2224-1	ISSR 49-6	iPBS 2221-3	iPBS 2074-4	iPBS2077+iPBS2239-1	ISSR 7-7	ISSR29-2	ISSR46-5	iPBS 2085-3	iPBS2085-5	ISSR22-5	iPBS 2231-8	iPBS 2074-4		۵۱۱/۰	۵۸۵/۰	۰۴/۰
تعداد پنجه کل	iPBS 2085-3	iPBS 2085-5	ISSR 46-6	ISSR 7-7	ISSR 22-5	iPBS2085-6										۲۷۳/۰	۳۲۳/۰	۰۴۳/۰
طول برگ پرچم	iPBS 2085-6	iPBS 2083-1	iPBS 2221-4	ISSR 45-4	iPBS 2221-6	ISSR7-2	iPBS 2074-2	IRAP33-1	ISSR7-5	ISSR 1-1	iPBS2239+iPBS2240-3	ISSR21-5	ISSR 31-4	iPBS 2074-4		۹۶۶/۰	۹۸۲/۰	۰۳۱/۰
	iPBS 2224-1	iPBS 2083-3	iPBS 2221-5	ISSR 16-6	ISSR 29-6	iPBS2083-8	iPBS 2081-1	ISSR47-10	iPBS2239+iPBS2240-2	ISSR 31-2	iPBS2077-1	ISSR47-3	ISSR 21-1	ISSR 21-4				
		iPBS 2224-6	iPBS 2221-7	ISSR 13-3	ISSR 29-4	ISSR46-3	iPBS 2076-2	iPBS2077+iPBS2239-5	iPBS2224-9	iPBS 2076-6	ISSR47-11	iPBS2239+iPBS2240-1	ISSR 1-2	ISSR 21-6				
عرض برگ پرچم	iPBS 2221-4	iPBS 2077-3	ISSR 16-6	ISSR 13-2												۱۸۵/۰	۲۲۳/۰	۰۴۷/۰
مساحت برگ پرچم	iPBS 2221-2	iPBS 2239-4	IRAP 33-2	ISSR 13-4	iPBS 2076-4	iPBS2074-2	IRAP 33-1	iPBS2224-9	ISSR 29-1							۴۲۷/۰	۴۸۷/۰	۰۳۵/۰
طول خروج از غلاف	ISSR 46-3	iPBS 2081-2	iPBS 2085-5	ISSR 7-5	iPBS 2083-4											۳۸۶/۰	۴۲۲/۰	۰۴۹/۰

ادامه جدول ۷- نتایج تجزیه ارتباط با استفاده از رگرسیون گام‌به‌گام برای داده‌های مولکولی و صفات مورفولوژیک در شرایط غرقاب در ژنوتیپهای برنج

صفت	نشانگر															R2 تصحیح شده	ضریب تبیین	سطح معنی‌داری
قطر ساقه	ISSR 47-7	iPBS 2239-1	iPBS2085-4	iPBS2081-1	IRAP33-4	iPBS 2224-6	ISSR 47-6	ISSR 29-2	iPBS2239-10	iPBS 2081-5	ISSR30-7	iPBS2221-7	ISSR 29-6	iPBS2239 +iPBS2240-3	iPBS2081-6	۵۷۶/۰	۶۵/۰	۰۴۱/۰
طول خوشه اصلی	ISSR 16-1	iPBS 2083-1	ISSR13-6	ISSR47-10	ISSR16-4	iPBS 2074-7	iPBS 2238-6	iPBS 2224-4	iPBS2238-3	ISSR 14-6	iPBS2221-4	iPBS2083-4	ISSR 31-2	ISSR14-3	ISSR31-4	۶۰۸/۰	۶۷۲/۰	۰۲۴/۰
وزن کل خوشه‌ها	iPBS 2083-1	ISSR49-1	ISSR43-3	ISSR16-3	iPBS 2224-1	iPBS 2085-2	ISSR 47-3	iPBS2083-2	ISSR 13-3	iPBS2085-4	ISSR14-6	ISSR 43-2				۶۰۱/۰	۶۵۷/۰	۰۱۷/۰
وزن خوشه اصلی	iPBS 2076-5	iPBS2074-7	iPBS2224-9	ISSR29-3	iPBS 2231-6	iPBS 2074-2	ISSR 47-3	ISSR13-6	iPBS 2239-3	iPBS2239 +iPBS2240-4	iPBS2074-1	ISSR 31-8	iPBS2076-3	ISSR46-3		۶۳۶/۰	۷۰۵/۰	۰۲۶/۰
وزن کل ساقه‌ها	ISSR 46-6	ISSR30-2	iPBS2237 +iPBS2240-8	ISSR31-2	ISSR 13-2	IRAP 33-7	iPBS 2083-4	iPBS2237 +iPBS2240-7				ISSR 47-7	iPBS2081-5	iPBS2083-1		۴۰۹/۰	۴۶۴/۰	۰۴۲/۰
تعداد دانه پر	iPBS 2081-1	IRAP33-2	iPBS2081-6	iPBS2077 +iPBS2239-6	ISSR 21-1	iPBS 2085-1	iPBS 2221-4	iPBS2239-5	iPBS 2076-9	IRAP33-7	iPBS2239 +iPBS2240-4	ISSR 46-3				۵۵۳/۰	۶۱۵/۰	۰۴۸/۰
تعداد دانه پوک	ISSR 1-5	iPBS2077 +iPBS2239-5	ISSR49-3	ISSR31-2	IRAP 33-2	ISSR 43-1	ISSR 21-1	iPBS2083-3	iPBS 2083-4	ISSR47-7	iPBS2221-3	iPBS 2076-5	iPBS2221-1	iPBS2077 +iPBS2239-6		۶۶۲/۰	۷۲۵/۰	۰۲۵/۰
وزن دانه پر	iPBS 2239-3	iPBS2221-6 ISSR7-2 iPBS2239-1 iPBS2074-7 iPBS2239-2 IRAP33-1 ISSR 13-6	iPBS2074-7	iPBS2074-2	iPBS 2083-1	iPBS 2231-6	iPBS 2081-5	ISSR1-5	ISSR 49-1	iPBS2239 +iPBS2240-4	ISSR22-1	iPBS 2074-1	iPBS2085-1	ISSR46-3		۷۰۵/۰	۷۶۳/۰	۰۰۵/۰

ادامه جدول ۷- نتایج تجزیه ارتباط با استفاده از رگرسیون گام‌به‌گام برای داده‌های مولکولی و صفات مورفولوژیک در شرایط غرقاب در ژنوتیپهای برنج

صفت	نشانگر															R2 تصحیح شده	ضریب تبیین	سطح معنی‌داری
وزن دانه پرک	ISSR 43-2	iPBS2224-7	iPBS 2221-1	ISSR31-2	iPBS2237+ iPBS2240-7	ISSR 16-5										۵۳/۰	۵۴۲/۰	۰۳۳/۰
تعداد خوشچه اولیه	iPBS 2224-4	iPBS2081-6	iPBS 2076-3	iPBS2224-8	iPBS2076-5	iPBS 2081-7	iPBS 2074-4	iPBS2 224-6	IRAP 33-7	iPBS 2221-6	iPBS 2081-5	iPBS2238-6				۶۸۸/۰	۷۳۱/۰	۰۲۶/۰
تعداد خوشچه ثانویه	ISSR 14-5	iPBS2076-2	ISSR 47-4	IRAP33-7	iPBS2239+ iPBS2240-4	ISSR 46-3	iPBS 2074-1									۴۶۳/۰	۵۰۷/۰	۰۴۷/۰
بیوماس	ISSR 16-5	iPBS2237+ iPBS2240-7	iPBS 2076-4	iPBS2074-3	IRAP33-1	iPBS 2083-3	ISSR 1-5	ISSR4 7-6	ISSR 16-6	iPBS 2085-6	iPBS 2083-2	iPBS2221-2	ISSR 43-3	iPBS 2085-6	ISSR 16-6	۸۷۲/۰	۹۱۵/۰	۰۴۹/۰
روز تا گلدهی	ISSR 16-6	iPBS2083-4	ISSR 47-11	ISSR45-1	ISSR31-1	iPBS 2221-7	iPBS 2238-3	ISSR1 -5	ISSR 30-2	iPBS 2239-3	iPBS 2085-5					۴۸۹/۰	۵۵۴/۰	۰۲۹/۰
شاخص برداشت	ISSR 47-1	iPBS2076-2	ISSR 47-2	iPBS2076-7	ISSR43-2	ISSR 47-10	iPBS 2231-6	ISSR3 1-1	ISSR 7-1	ISSR 49-1	ISSR 7-5	ISSR16-6	iPBS 2239-3	iPBS 2076-3	iPBS 2077-2	۶۹۱/۰	۷۵۲/۰	۰۳۱/۰
عملکرد		iPBS2076-2	ISSR 7-5	iPBS2239+ iPBS2240-4	ISSR13-4	ISSR 1-5	iPBS 2081-5	iPBS2 239-11	iPBS 2081-3	iPBS 2083-1	iPBS 2231-7	iPBS2224-6	ISSR 21-5	iPBS 2076-3	ISSR 31-2 iPBS 2085-1	۵۱۴/۰	۵۹۳/۰	۰۳۷/۰
باروری	ISSR 43-1	ISSR22-2	ISSR 21-5	iPBS2081-6	iPBS2221-1	iPBS 2083-3	iPBS 2076-4	iPBS2 221-4	iPBS 2076-9	iPBS 2221-3	iPBS 2231-6	iPBS2238-7	iPBS 2083-1	iPBS 2231-8	ISSR 1-5	۶۵۵/۰	۷۲۳/۰	۰۳۸/۰
														ISSR 7-7	iPBS 2224-7			

جدول ۸- نتایج تجزیه ارتباط با استفاده از رگرسیون گام‌به‌گام برای داده‌های مولکولی و صفات مورفولوژیک در شرایط تنش خشکی در ژنوتیپهای برنج

صفت	نشانگر															ضریب تبیین	R2 تصحیح شده	سطح معنی‌داری
ارتفاع کل	ISSR 1-1	ISSR7-7	iPBS2239+ iPBS2240-3	iPBS2085-4	iPBS2085-5	iPBS 2083-4	iPBS 2074-4									۵۸۷/۰	۵۵/۰	۰۲۶/۰
تعداد پنجه بارور	iPBS 2224-6	iPBS2074-1	iPBS2224-9	ISSR31-8	ISSR16-1	iPBS 2076-2	ISSR 43-1	IRAP 33-4	iPBS 2085-5							۵۳/۰	۴۷۵/۰	۰۱۱/۰
تعداد پنجه کل	iPBS 2074-1	iPBS2231-2	ISSR31-2	ISSR13-2	iPBS2237+ iPBS2240-8	iPBS 2085-6	ISSR 21-1	iPBS 2085-5								۴۲۸/۰	۳۶۹/۰	۰۴/۰
طول برگ پرچم	ISSR 16-6	ISSR14-4	iPBS2239-6	iPBS2239+ iPBS2240-1	iPBS2077-2	ISSR 7-6	ISSR 46-1	ISSR 47-10	ISSR 1-4	iPBS2076-8	iPBS2 231-10	ISSR29-5	iPBS 2074-4	ISSR 13-6		۸۷۶/۰	۸۲۵/۰	۰۳۳/۰
				iPBS2224-8	iPBS2239+ iPBS2240-3	ISSR 30-7	iPBS 2085-6	ISSR 47-8	iPBS 2076-9	iPBS2239+ iPBS2240-4	iPBS2 076-1	ISSR14-6	ISSR 31-3	ISSR 29-2				
عرض برگ پرچم	ISSR 43-3	iPBS2239+ iPBS2240-2	IRAP33-3	ISSR1-3	ISSR22-4	ISSR 1-1	iPBS 2239-1	ISSR 7-7	ISSR 30-7	ISSR1-4	ISSR2 1-6	iPBS2237+ iPBS2240-8	iPBS 2221-5	iPBS 2074-2		۶۷۸/۰	۶۱۵/۰	۰۳۶/۰
مساحت برگ پرچم	ISSR 14-4	iPBS2239-3	iPBS2081-7	iPBS2076-5	IRAP33-4	ISSR 29-5	ISSR 31-3	ISSR 21-1	ISSR 1-3	ISSR43-3	iPBS2 074-4	ISSR31-2	ISSR 47-2	ISSR 13-4		۷۶/۰	۷۰۵/۰	۰۲۹/۰
													iPBS 2074-2	iPBS 2224-5				

ادامه جدول ۸- نتایج تجزیه ارتباط با استفاده از رگرسیون گام‌به‌گام برای داده‌های مولکولی و صفات مورفولوژیک در شرایط تنش خشکی در ژنوتیپهای برنج

صفت	نشانگر														R2 تصحیح شده	ضریب تبیین	سطح معنی‌داری
طول خروج از غلاف									iPBS2085-4	iPBS2077+iPBS2239-3	ISSR47-9	ISSR31-1	ISSR47-2	iPBS2077+iPBS2239-1	ISSR7-2	ISSR22-4	ISSR7-5	ISSR46-3	iPBS2083-4	۶۲۶/۰	۶۷۴/۰	۰۴۷/۰
قطر ساقه					ISSR47-7	ISSR16-3	iPBS2239-4	iPBS2239+iPBS2240-4	iPBS2221-6	iPBS2077+iPBS2239-1	iPBS2231-7	ISSR49-6	ISSR22-1	ISSR46-3	iPBS2221-7	۴۹۹/۰	۵۶۳/۰	۰۲۵/۰
طول خوشه اصلی	iPBS2231-9	iPBS2238-6	ISSR31-4	ISSR14-3	iPBS2239+iPBS2240-4	IRAP33-3										۳۱۵/۰	۳۶۳/۰	۰۲۶/۰
وزن کل خوشه‌ها	iPBS2085-6	iPBS2239+iPBS2240-3	ISSR21-5	iPBS2231-7	ISSR13-2	ISSR46-3	ISSR7-3	iPBS2221-3	ISSR30-7	iPBS2077+iPBS2239-6	ISSR14-3	iPBS2076-4	iPBS2081-3	iPBS2085-1		۸۳۴/۰	۸۸۶/۰	۰۳۶/۰
		ISSR16-6	iPBS2077-3	iPBS2077-8	ISSR29-6	ISSR29-4	ISSR21-1	iPBS2077+iPBS2239-2	ISSR46-6	iPBS2239+iPBS2240-4	ISSR7-2	iPBS2221-6	ISSR47-9	ISSR1-3			
وزن خوشه اصلی	iPBS2076-5	ISSR7-3	iPBS2083-3	iPBS2221-4	ISSR22-2	ISSR1-3	ISSR21-5	ISSR14-3	iPBS2076-9	iPBS2239+iPBS2240-4	iPBS2221-6	IRAP33-7	iPBS2085-1	ISSR46-3		۷۰۱/۰	۷۶۳/۰	۰۴۷/۰
											iPBS2221-5	ISSR46-2	iPBS2081-1	ISSR45-1				
وزن کل ساقه‌ها	ISSR16-1	ISSR31-4	iPBS2239+iPBS2240-4	iPBS2074-4	iPBS2083-4	iPBS2238-3	ISSR47-8	iPBS2237+iPBS2240-8								۳۷۷/۰	۴۳۵/۰	۰۲۴/۰
تعداد دانه پر	iPBS2221-3	iPBS2239+iPBS2240-4	iPBS2231-5	ISSR46-3												۲۸۶/۰	۳۱۹/۰	۰۱۲/۰

ادامه جدول ۸- نتایج تجزیه ارتباط با استفاده از رگرسیون گام‌به‌گام برای داده‌های مولکولی و صفات مورفولوژیک در شرایط تنش خشکی در ژنوتیپهای برنج

صفت	نشانگر										R2 تصحیح شده	ضریب تبیین	سطح معنی‌داری
تعداد دانه پرک	iPBS2239+iPBS2240-3	IRAP33-2	iPBS2077+iPBS2239-4	iPBS2077+iPBS2239-6	ISSR1-4	ISSR31-2					۵۰۱/۰	۵۳۶/۰	۰۱۴/۰
وزن دانه پر	iPBS2239+iPBS2240-4	iPBS2074-3	iPBS2221-6	ISSR14-3	ISSR21-1	iPBS2076-9	iPBS2085-1	ISSR46-3			۷۳۶/۰	۷۹۸/۰	۰۴۶/۰
iPBS2224-9	ISSR7-1	iPBS2224-8	iPBS2238-7	iPBS2077+iPBS2239-6	iPBS2083-3	iPBS2076-8	ISSR30-7	ISSR1-1					
وزن دانه پرک	iPBS2224-9	iPBS2238-3	iPBS2231-2	iPBS2077+iPBS2239-3	iPBS2231-8	iPBS2077+iPBS2239-6	IRAP33-2	ISSR31-2	ISSR1-4		۶۴۲/۰	۷۰۸/۰	۰۴۸/۰
	iPBS2231-3	ISSR46-5	ISSR1-3	iPBS2081-5	ISSR45-2	ISSR21-1	iPBS2221-6						
تعداد خوشچه اولیه	iPBS2224-8	ISSR31-2	iPBS2221-1	iPBS2076-7	iPBS2231-6	iPBS2081-5	ISSR22-4				۳۴۲/۰	۳۹۵/۰	۰۳۶/۰
تعداد خوشچه ثانویه	iPBS2085-4	iPBS2074-2	iPBS2221-3	IRAP33-7	iPBS2077-8	iPBS2221-4	iPBS2239+iPBS2240-4	ISSR46-3			۴۹۳/۰	۵۴/۰	۰۴۳/۰
بیوماس	ISSR22-3	ISSR47-8	ISSR22-2	iPBS2077-2							۲۱۶/۰	۲۴۸/۰	۰۳۹/۰
روز تا گلدهی	ISSR47-8	iPBS2221-2	ISSR45-2	ISSR1-1	iPBS2239-3	ISSR30-1	iPBS2076-2	ISSR14-4	iPBS2238-6	iPBS2076-9	۴۷۷/۰	۵۴۴/۰	۰۳۶/۰
شاخص برداشت	iPBS2077-3	iPBS2231-6	ISSR22-5	ISSR22-3	ISSR31-1	iPBS2085-1	iPBS2076-9	iPBS2239+iPBS2240-1			۳۷۶/۰	۴۳۴/۰	۰۳۵/۰
عملکرد	ISSR22-4	ISSR14-3	ISSR1-5	iPBS2077-3	ISSR21-3	iPBS2239+iPBS2240-4	iPBS2085-1				۳۹۸/۰	۴۴۷/۰	۰۴۲/۰
باروری	iPBS2085-2	iPBS2076-9	ISSR21-5	iPBS2239+iPBS2240-4	ISSR31-2	iPBS2077+iPBS2239-3	iPBS2077+iPBS2239-6	ISSR47-1	iPBS2083-1	iPBS2074-3	۵۲۲/۰	۵۸۳/۰	۰۴۴/۰

بحث

آگاهی از میزان تنوع ژنتیکی ژرم‌پلاسم و رابطه ژنتیکی بین ژنوتیپها به محافظت و استفاده مناسب از منابع ژنتیکی کمک شایانی می‌کند (۲ و ۲۲). مطالعه و بررسی تنوع ژنتیکی به روشهای مختلفی صورت می‌پذیرد، اما در بین روشهای مورد استفاده بررسی در سطح مولکولی و ماده ژنتیکی، جدیدتر، راحت‌تر، قابل‌اعتمادتر و با سرعت بیشتری انجام می‌شود (۵ و ۶).در مطالعه‌ای دیگر بر روی ۱۸ ژنوتیپ جو از ۳۴ آغازگر ISSR ارزیابی‌شده ۹ آغازگر با الگوی نواربندی مناسب تولید شده است. این آغازگرها ۶۱ نوار با میانگین ۸۷/۶ نوار به ازای هر آغازگر تولید نموده‌اند که از این میان ۱۱ نوار یک‌شکل و ۵۰ نوار چند شکل بوده است. میانگین درصد چندشکلی برای تمامی آغازگرهای استفاده‌شده ۲۹/۸۲ درصد و میزان اطلاعات چندشکلی برای آغازگرهای مورد بررسی بین ۳/۰ تا ۵۷/۰ متفاوت بوده است. شاخص نشانگر نیز بین ۵/۱ تا ۵۶/۴ بوده است این گروه از محققین عنوان می‌نمایند که آگاهی از روابط ژنتیکی ژنوتیپها روشی مناسب برای کسب اطلاعات ارزشمند برای جهت‌دهی به برنامه‌های به نژادی و مدیریت منابع ژرم‌پلاسم می‌باشد (۵). ISSR و نشانگرهای رتروترانسپوزونی بازتاب خوبی از تنوع درون، بین‌گونه‌ای و ارقام را به نمایش می‌گذارند (۱۶). در این مطالعه نیز نشانگرهای مورد استفاده تنوع خوبی را در ژرم‌پلاسم برنج مورد بررسی به معرض نمایش گذاشتند به‌گونه‌ای که بالاترین میزان شاخصهایی مثل محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC) شاخصی که برای نشان دادن ارزش یک نشانگر در نمایش چندشکلی موجود درون یک جمعیت به کار می‌رود و معیار دقیقی که مستقل از تعداد نمونه مورد مطالعه عمل می‌کند (۱۵) به همراه میزان شاخص اطلاعات شانون و معیار تنوع ژنی نی در نشانگر ISSR22 دیده شد. در تجزیه به مؤلفه‌های اصلی همان‌گونه که انتظار می‌رفت مؤلفه اول بیشترین میزان تغییرات را توجیه نمود در اطلاعات حاصل از نشانگرهای مولکولی کم بودن درصد تبیین تغییرات مولکولی در تجزیه‌های چندمتغیره مثل تجزیه به مؤلفه‌های اصلی اول، بر مستقل بودن مکانها و نشانگرهای مورد مطالعه و توزیع مناسب آنها در نواحی مختلف ژنوم دلالت دارد. درصورتی‌که نشانگرها از بخشهای مختلف ژنوم انتخاب شده باشند پیوستگی بین آنها کم خواهد بود و درنتیجه تعداد بیشتری مؤلفه برای توجیه کل تغییرات لازم است و توزیع مناسب نشانگرها در سراسر ژنوم به معنی سنجش دقیق‌تر و بهتر تنوع مولکولی به دلیل نمونه‌برداری مناسب از کل ژنوم است (۱، ۹، ۱۳ و ۲۳)؛ بنابراین نتایج تجزیه به مؤلفه های اصلی در این بررسی نشان داد که نشانگرهای مورد بررسی در این مطالعه در نواحی مختلف ژنوم پراکنده هستند. پیوستگی ژنتیکی بین نشانگرها و مکانهای ژنی صفات کمی، محتمل‌ترین توجیه برای ارتباط بین نشانگرهای مولکولی و صفات کمی می‌باشد استفاده از پیوستگی بین نشانگرهای مولکولی و ژنهای کنترل‌کننده صفات کمی، فرآیند شناسایی جایگاههای ژنی مؤثر در صفات و بنابراین به نژادی گیاهان را تسریع می‌نماید (۳۰). بر اساس نتایج حاصل از این بررسی می‌توان اظهار داشت که این نشانگرها پتانسیل استفاده به کمک نشانگر برای صفات مورد بررسی را دارا هستند و پویش در نواحی کروموزومی اطراف این نشانگرها می‌تواند محققین را در شناسایی ژنهای کنترل‌کننده صفات موردنظر یاری نماید. در بررسی که بر روی ۴۸ ژنوتیپ برنج به کمک ۱۸ نشانگر SSR صورت پذیرفته است بیشترین نشانگرهای مثبت مرتبط با صفات برای طول دانه، طول ریشک و کمترین نشانگر مثبت برای عرض دانه، عرض لما و جرم حجمی شناسایی شده است. بیشترین تغییرات مربوط به صفت عرض دانه (۹۸ درصد) توسط نشانگر RM282 و کمترین ضریب تبیین مربوط به عرض پالئا (۶ درصد) به کمک نشانگر RM6283 تبیین شده است. این محققین این‌گونه نتیجه‌گیری نموده‌اند که با توجه به اینکه اکثر آغازگرهای

مورد استفاده بر صفات مورد مطالعه مؤثر بوده‌اند بنابراین به‌احتمال‌زیاد بتوان از این آغازگرها همراه با اطلاعات مربوط به صفات مورفولوژیک در اصلاح ارقام برنج و شناسایی والدین مناسب برای تولید ارقام هیبرید استفاده نمود (۸). نتایج تجزیه خوشه‌ای در این مطالعه نشان داد ژنوتیپهایی که در یک گروه قرار دارند باوجود تفاوتهای ظاهری توالیهای تکراری مشابه در ساختمان ژنوم خود دارند. چون نشانگرهای مورداستفاده جزء نشانگرهای تصادفی می‌باشند بنابراین قرارگیری ژنوتیپهای متفاوت در کنار هم شاید به علت تکثیر مناطق غیر رمز کننده توسط نشانگرهای مورداستفاده و تأثیر عوامل محیطی در بروز صفات ریختی ژنوتیپهای مورد بررسی در این مطالعه باشد.

نتیجه‌گیری کلی

بررسی تنوع ژنتیکی به کمک نشانگرهای ISSR، IRAP و iPBS بازتاب خوبی از تنوع ژنوتیپهای مورد بررسی را به نمایش گذاشت. بیشترین تعداد نوار چند شکل در بین آغازگرهای مورد مطالعه مربوط به نشانگر ISSR9 با ۱۲ نوار چند شکل و کمترین آن متعلق به آغازگر ترکیبی iPBS2239+iPBS2240 با ۴ نوار چند شکل بود. بالاترین میزان اطلاعات چند شکل، تعداد آللهای مؤثر، شاخصهای تنوع ژنی نی و شانون مربوط به آغازگر ISSR22 بود. میانگین شاخص نشانگر برای کلیه نشانگرهای موردبررسی ۵۷/۲ به دست آمد. در شرایط بدون تنش بیشترین ارتباط معنی‌دار با بالاترین ضریب تبیین (۹۸/۰) مربوط به آلل iPBS2224-6 در صفت طول برگ پرچم بود. در شرایط تنش خشکی بیشترین ارتباط معنی‌دار در صفت وزن کل خوشه‌ها در ارتباط با آلل ISSR16-6 به‌عنوان آلل سرگروه با ضریب ۸۹/۰ تبیین گردید. تجزیه به مؤلفه‌های اصلی نشان داد که نشانگرها در ژنومهای مورد بررسی از توزیع مناسبی برخوردار هستند و بنابراین این امر سنجش دقیق تنوع مولکولی از کل ژنوم، ژنوتیپهای مورد بررسی را فراهم ساخت؛ در کل می‌توان گفت که با بررسی بیشتر آللهای شناسایی‌شده در ارتباط با صفاتی مثل طول برگ پرچم، وزن خوشه‌اصلی در شرایط بدون تنش و وزن کل خوشه‌ها می‌توان از نشانگرهای مولد این آللها در گزینش به کمک نشانگر بهره‌برداری نمود.

منابع

۱- اعلمی، ع. کرمی، ن. ۱۳۹۵. بررسی تنوع ژنتیکی ارقام برنج ایرانی با استفاده از نشانگرهای ISSR،IRAP و REMAP. پژوهشنامه اصلاح گیاهان زراعی. ۲۰: ۴۱-۵۱.

۲- خدادوست، ع. یوسف‌زاده، ح. امیرچخماقی، ن. عبدالهی، ح. حسین‌زاده کلاگر، ا. ۱۳۹۵. تنوع ژنتیکی سیب شرقی (*Malus Orientalis* Uglitz.) جنگل هیرکانی ایران، با استفاده از نشانگر ISSR-PCR. ۴: ۱-۱۴.

۳- رئیسی، ط. صبوری، ع. ۱۳۹۴. اعتبارسنجی و تجزیه ارتباطی نشانگرهای ریز ماهواره مرتبط با تحمل به تنش خشکی و شوری در برنج‌های هوازی و ایرانی تحت تنش اسمزی. مجله علمی پژوهشی زیست‌فناوری گیاهان زراعی. ۱۰: ۵۷-۷۲.

۴- سرایلو، م. صبوری، ح. دادرس، ا. ۱۳۹۴. بررسی تنوع ژنتیکی ژنوتیپهای برنج با استفاده از نشانگرهای ریز ماهواره و ارتباط آنها با صفات مورفولوژیک مرحله گیاهچه‌ای تحت شرایط نرمال و تنش خشکی. تحقیقات غلات. ۱: ۱-۱۵.

۵- سفالیان، ا. اصغری، ع. رسول زاده، ع. سیفی، ر. جماعتی، ش. فیروزی، ب. ۱۳۹۴. ارزیابی تنوع ژنتیکی و گروه‌بندی ژنوتیپهای مختلف جو بهاره تحت شرایط تنش خشکی با استفاده از صفات مرفوفیزیولوژیک و نشانگرهای ISSR. نشریه زراعت دیم ایران. ۲: ۱۲۹-۲۲۳.

۶- صفری، ه. شیروانی، ه.فریدونی، ل. ۱۳۹۶. بررسی تنوع ژنتیکی برخی از ژنوتیپهای چچم دائمی (*Lolium perenne*) با استفاده از نشانگرهای مولکولی و بیوشیمیایی. مجله پژوهشهای سلولی و مولکولی (مجله زیست شناسی ایران)۴: ۱-۱۴.

۷- عبدالشاهی، ر. امیری، م. طالعی، ع. ر. یزدی صمدی، ب. ۱۳۸۹. ارزیابی ژنوتیپهای گندم نان از لحاظ تحمل به خشکی. مجله الکترونیک تولید گیاهان زراعی. ۳: ۱۵۹-۱۷۱.

۸- علیزاده، م. تجزیه ارتباط برخی از صفات گل و دانه در برنج با استفاده از نشانگرهای رتروترانسپوزونی. پایان‌نامه کارشناسی ارشد. دانشگاه گیلان. ۱-۲۰.

۹- فاضلی، ف. چقامیرزا، ک. ۱۳۹۰. تنوع ژنتیکی نخود زراعی تیپ کابلی ایران بر اساس صفات زراعی و نشانگر RAPD. مجله به‌نژادی نهال و بذر. ۴: ۵۵۵-۵۸۰.

۱۰- قادری، ف. **صادق‌زاده**، ب. بابائیان جلودار، ن. عبدالهی مندولکانی، ب. ۱۳۹۵. اشباع نقشه ژنتیکی جو با استفاده از نشانگرهای رتروترنسپوزونی و جمعیت دابل هاپلوئیدی حاصل از تلاقی Clipper×Sahara. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی. ۳: ۶۶-۸۲.

۱۱- قره خانی، م. نواب‌پور، س. صبوری، س. رمضانپور، س.س. ۱۳۹۵. بررسی تنوع ژنتیکی در ارقام برنج موجود در ایران با استفاده از نشانگرهای SSR. پژوهشنامه اصلاح گیاهان زراعی ۲۰: ۱۰۷-۱۱۵.

۱۲- مسعودی، ح. صبوری، ح. طلیعی، ف. آلت جعفربای، ج. ۱۳۹۶. بررسی تنوع ژنتیکی و ارتباط برای صفات مرفوفنولوژیک و مقاومت به بیماری سفیدک پودری در ژرم‌پلاسم گندم با استفاده از نشانگرهای مولکولی ISSR، IRAP و iPBS. مجله علمی پژوهشی زیست‌فناوری گیاهان زراعی. ۱۸: ۴۱-۵۶.

۱۳- نادری، ح. شکرپور، م. اصغری، ع. کانونی، ه. اسفندیاری، ع. ۱۳۹۳. بررسی تنوع ژنتیکی لاینهای نخود با استفاده از نشانگرهای مولکولی ISSR. مجله علوم گیاهان زراعی ایران. ۴: ۵۰۹-۵۱۹.

۱۴- نعمت زاده، ق. طالبی، ر. خدارحم‌پور، ز. کیانی، غ. ۱۳۸۲. بررسی تنوع ژنتیکی و جغرافیایی برنج با استفاده از صفات فیزیولوژیکی و زراعی. مجله علوم زراعی ایران. ۵: ۲۲۵-۲۳۴.

15- Botstein, D. White, R. L. Skolnick M. and Davis, R. W.1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. The American Journal of Human Genetics. 32: 314- 331.

16- Carvalho, A. Lima-Brito, J. Macas, B. and Guedes-Pinto, H. 2009. Genetic diversity and variation among botanical varieties of old Portuguese wheat cultivars revealed by ISSR assays. Biochemical Genetics. 47: 276-294.

17- Hamrick, J.L. and Godt, M.J.W. 1996. Conservation genetics of endemic plant species. In: Avise, J.C. Hamrick, J. L. (Eds.), Conservation Genetics: Case Histories from Nature. Chapman and Hall, New York.

18- Kalendar R, Antonius K, Smýkal P, Schulman AH. 2010. iPBS: a universal method for DNA fingerprinting and retrotransposon isolation. Theor Appl Genet. 121(8):1419-30.

19- Kalendar R. 2011. The Use of Retrotransposon-Based Molecular Markers to Analyze Genetic Diversity. Field Veg. Crop Res. 48 (2011) 261-274

20- Kimuraz, M. and Crow, J. F. 1964. The number of alleles that can be maintained in a population. Genetics. 49: 725-738

21- Lewontin, R.C. 1972. The apportionment of human diversity. Evolution of Biology. 6: 381-398.

22- Matus, I.A. and Hayes, P.M. 2002. Genetic diversity in three groups of barley germplasm assessed by simple sequence repeats. Genome. 45: 1095-1106.

23- Mohammadi, S. A. and Prasanna, B. M. 2003. Analysis of genetic diversity in crop plant-salient statistical tools and consideration. Crop Science. 43: 1235-1248.

24- Nei, M. (1973). Analysis of gene diversity in subdivided populations. Proceeding National Academic Science. 70: 3321-3323.

25- Pandey, V. and Shukla, A. 2015. Acclimation and tolerance strategies of rice under drought. Rice Science. 22: 147−161.

26- Powell, W. Morgante, M. Andre, C. Hanafey, M. Vogel, J. Tingey, S. and Rafalsky, A. 1996. The comparison of RFLP, RAPD, AFLPand SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. Molecular Breeding. 2: 225-238

27- Prince, S. Beena, R. Gomez, M. Senthive, A. and Babu C. 2015. Mapping consistent rice (*Oryza sativa* L.) yield QTLs under drought stress in target. Rice 8: 1-13.

28- Roldan-Ruiz, F. A. Gilliland, T. J. Dubreuil, P. Dillmann, C. Lallemand, J. 2001. A comparative study of molecular and morphological methods of describing relationships between perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) varieties. Theoretical and Applied Genetics. 103: 1138-1150.

29- Saghai Mroof, M.A. Biyashev, R.M. Yang, G.P. Zhang, Q. and Allard, R.W. 1994.

Extraordinarily polymorphic DNA in barely species diversity, chromosomal location, and population dynamics, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 91: 5466–5570.

30- Virk, P.S. Ford-Lioyd, B.V. Jackson, M.T. Pooni, H.S. Clemeno T.P. and Newbury, H.J. 1995. Marker assisted prediction of agronomic traits using diverse rice germplasm. Third International Rice Genetics Symposium, 16 to 20 October Manila, Philippines. 307-316.

Identification of ISSR, IRAP and iPBS markers containing information on rice characteristics under two conditions of flooding and drought stress

Badirdast H.B.[1], Salehi-Lisar S.Y.[1], Sabouri H.[2] Movafeghi A.[1] and Gholamalalipour Alamdari E.[2]

[1] Dept. of Plant Sciences, Faculty of Natural Sciences, University of Tabriz, Tabriz, I.R. of Iran

[2] Dept. of Plant Production, Faculty of Agriculture Science and Natural Resource, University of Gonbad Kavus, Gonbad Kavus, I.R. of Iran

Abstract

Rice is the main food for more than half of the world population. Due to the high water requirement of rice and the shortage of water resources, drought is always one of the limiting factors for cultivation of this plant. So, this research was conducted to investigate the genetic diversity and the association mapping of 23 morphological traits of the ISSR, IRAP and iPBS molecular markers using 112 rice genotypes. The results of multivariate regression showed that, 137 and 120 allele types were significantly associated with at least one of the studied traits under non-stress and drought stress conditions, respectively. The explanatory factor of total awareness indicators in control condition was 0.98 to 0.22% and under drought stress condition it 0.89 to 0.25%. Under stress-free condition, iPBS2224-6 allele for flag leaf length (0.98) and under stress condition of ISSR16-6 allele for total weight of panicle (0.89) had the highest explanatory factor as header marker. A considerable amount of morphological changes were justified using ISSR22 initiator with the highest polymorphic content (PIC) of 0.49%, effective alleles number of 1.88, genetic diversity index of 46.0 and Shannon index of 0.66. Marker index varied from 5.47 to 0.50. These results indicate that markers that highly associated with morphological traits can be used to identify continuous knowledge indicators with important traits of rice genotypes, especially in drought stress conditions.

Key words: Rice, association mapping, morphological traits, ISSR, informative markers