

شناسایی ژن‌ها و نشانگرهای مولکولی مرتبط با عملکرد و صفات زراعی مهم برنج در شرایط تنش خشکی

مهراوه تسلیمی^۱، عاطفه صبوری^{۲*}، امین عابدی^۳

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد ژنتیک و به‌نژادی گیاهی گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده علوم کشاورزی دانشگاه گیلان، رشت، ایران.

۲. دانشیار ژنتیک و به‌نژادی گیاهی گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده علوم کشاورزی دانشگاه گیلان، رشت، ایران.

۳. دانش‌آموخته دکتری بیوتکنولوژی، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده علوم کشاورزی دانشگاه گیلان، رشت، ایران.

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۲/۵ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۴/۱۰)

Identification of genes and molecular markers related to rice yield and agronomic traits under drought stress condition

Mehraneh Taslimi¹, Atefeh Sabouri^{2*}, Amin Abedi³

1. M.Sc. Student of Genetics and Plant Breeding, Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran.

2. Associate Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran.

3. PhD of Biotechnology, Department of Biotechnology, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran.

(Received: May, 24, 2020 - Accepted: Jun. 30, 2020)

Abstract

Drought is one of the most important limiting factors for economic produce crops especially rice in the world. In order to identify related markers to yield and agronomic traits under drought stress condition, 40 recombinant inbred lines F₉ (RILs) derived from IR28 and Shah-Pasand varieties evaluated at Rice Research Institute of Iran (Rasht) in the spring and summer 2018, as randomized block design with three replications. In this regard, 110 SSR and EST-SSR markers were assessed on parents of population and identified 41 markers had proper polymorphism between two parents. According to the regression analysis results, 24 and 22 significant markers identified under normal and drought stress conditions respectively. The maximum adjusted (R²) under normal and drought stress conditions were assigned to RM3496 linked to days to flowering (24.8%) and RMES6-1 linked to panicle exertion (28.1%), respectively. Two markers RM211 and RM6697 had the most number of significant relationship with different traits including panicle length, flag leaf length, number of filled grains per panicle, the total number of grain per panicle, and weight of filled grain per panicle under non-stress and drought stress conditions respectively. According to the bioinformatics searches, the maximum gene expression pattern under drought stress condition was related to gene with accession code LOC_Os01g43370. The identified informative markers and the detected genes by bioinformatics approaches after validation can be utilized in marker assisted-selection (MAS) or gene transfer approaches for improving rice yield and tolerance to drought stress.

چکیده

خشکی از مهم‌ترین عوامل محدود کننده برای تولید اقتصادی محصولات زراعی به خصوص برنج در دنیا است. به منظور شناسایی نشانگرهای مرتبط با عملکرد و صفات زراعی برنج تحت تنش خشکی، تعداد ۴۰ رگه خویش‌آمیخته برنج از نسل نهم (F₉) حاصل از تلاقی ارقام شاه-پسند IR28 در مزرعه تحقیقاتی مؤسسه تحقیقات برنج کشور (رشت) در بهار و تابستان ۱۳۹۷ در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار مورد بررسی قرار گرفتند. در این راستا، چندشکلی ۱۱۰ نشانگر SSR و EST-SSR بین والدین جمعیت ارزیابی و ۴۱ نشانگر، چندشکل مناسبی نشان دادند. نتایج به دست آمده از تجزیه رگرسیونی تحت شرایط بدون تنش و تنش به ترتیب ۲۴ و ۲۲ نشانگر معنی دار شناسایی نمود. بیش‌ترین ضریب تبیین (R²) در شرایط بدون تنش مربوط به نشانگر RM3496 برای تعداد روز تا گلدهی (۲۴/۸ درصد) و در شرایط تنش، مربوط به نشانگر RMES6-1 برای صفت میزان خروج خوشه از غلاف (۲۸/۱ درصد) بود. نشانگرهای RM211 و RM6697 به ترتیب در شرایط بدون تنش و تنش خشکی، بیشترین ارتباط معنی‌دار را با صفات مختلف از جمله طول خوشه، طول برگ پرچم، تعداد دانه بارور در خوشه، تعداد دانه کل در خوشه و وزن دانه بارور در خوشه داشتند. بر اساس جستجوهای بیوانفورماتیکی، بیش‌ترین الگوی بیان در شرایط تنش خشکی مربوط به ژن با کد دسترسی LOC_Os01g43370 بود. از نشانگرهای آگاهی‌بخش و ژن‌های شناسایی شده توسط روش‌های بیوانفورماتیکی، می‌توان پس از تأیید اعتبار، برای انتخاب به کمک نشانگر، جهت انتقال ژن و بهبود عملکرد برنج در شرایط تنش خشکی مورد استفاده قرار داد.

Keywords: Abiotic stress, QTL, SSR, regression.

واژه‌های کلیدی: رگرسیون، تنش غیر زیستی، QTL، SSR.

مقدمه

(2013). تاکنون مطالعات زیادی در ارتباط با شناسایی مکان‌های ژنی کنترل‌کننده صفات مرتبط با تنش خشکی در برنج در داخل و خارج از کشور انجام شده است. Yadaw و همکاران (۲۰۱۳) با استفاده از یک نقشه ژنتیکی تلاقی برگشتی مشتق شده از تلاقی IR77298-5-6-18/2*Sabitri، یک QTL بزرگ اثر برای عملکرد دانه روی بازوی کروموزوم ۳ نزدیک نشانگر RM231 شناسایی نمودند. این QTL، ۲۳/۴٪ از واریانس فنوتیپی را تحت تنش شدید خشکی در دو مکان آزمایش فیلیپین و نپال توجیه نمود. همچنین در تجزیه این جمعیت، محدوده‌ای از ژن‌های مربوط به تحمل به خشکی و تعداد روز تا ۵۰ درصد گلدهی شناسایی شد. این نتایج نشان داد مدیریت هنگام خشکی و استفاده از روش به‌نژادی کلاسیک مانند روش بالک می‌تواند باعث سرعت بخشیدن به توسعه ارقام متحمل به خشکی از طریق به‌نژادی به کمک نشانگر و شناسایی QTL‌های مربوط به عملکرد دانه تحت تنش خشکی شود. در آزمایشی Ghrekhani و همکاران (۲۰۱۶) در بررسی تنوع ژنتیکی ۳۸ رقم برنج ایرانی، آزمایشی در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی طراحی نموده و از ۱۴ نشانگر SSR استفاده کردند. به دلیل فواصل ژنتیکی زیاد بین ارقام تنوع بالایی دیده شد و تجزیه به مولفه‌های اصلی ۶۲٪ از تغییرات را توجیه کرد. از میان نشانگرهای ریزوماهواره مورد استفاده در این مطالعه، نشانگرهای RM341، RM255، RM142 و RM262 قدرت تمایز بالایی داشتند. آنها دریافتند ارقام موجود در ایران از تنوع بالایی برخوردارند و می‌توان در برنامه‌های به‌نژادی از تنوع موجود در آنها بهره گرفت.

جمعیت رگه‌های خویش‌آمیخته نوترکیب، یکی از بسترهای بسیار ارزشمند نسبت به جمعیت‌های متناظر در حوزه به‌نژادی است. تعداد افراد مورد نیاز در ارزیابی‌های فنوتیپی برای جمعیت‌های F₂ و BC بسیار بیشتر از لاین‌های جمعیت رگه‌های خویش-آمیخته نوترکیب است (Ebadi, 2013). به دلیل

برنج (*Oryza sativa* L.) به عنوان غذای اصلی و مهم بیش از نیمی از جمعیت جهان که در مناطق روستایی و شهری مرطوب و نیمه‌مرطوب آسیا زندگی می‌کنند، محسوب می‌گردد (Ngangkham *et al.*, 2010). مهم‌ترین چالش جهان امروز، امنیت غذایی و تأمین نیاز اولیه‌ی انسان است (Essiet, 2001). فائو پیش‌بینی کرده است ذخایر جهانی برنج به حدود ۱۷۷ میلیون تن خواهد رسید که تقریباً ۴/۶ تن بیشتر از ۲۰۱۷-۱۸ می‌باشد (FAO, 2018). در حال حاضر برای پاسخ به تقاضای افزایش جمعیت، نیاز به افزایش تولید برنج است (Senadhira, 1987). برنج یک منبع عمده از کالری غذای جهان است و به عنوان یک گیاه غرقابی یکی از حساس‌ترین گیاهان در برابر کمبود آب است و بیش‌ترین نیاز آبی را در بین غلات دارد (Sabouri and Hosseini, 2018). گیاه برنج حدود ۹۰ درصد از آب مورد استفاده در تولید محصولات زراعی را مصرف می‌کند (Barker *et al.*, 1999).

خشکی یکی از مهم‌ترین خطرات جدی برای تولید مناسب محصولات زراعی به خصوص برنج در دنیا است که ممکن است در هر زمان از فصل رشد اتفاق بیفتد. به همین جهت، یکی از چالش‌های مهم در کشاورزی تولید غذای بیشتر با آب کمتر است (Tuyen and Prasad, 2008). چون مشکل خشکی در بسیاری از مناطق کشاورزی وجود دارند. این تنش‌ها می‌توانند منتج به کاهش شدید عملکرد محصولات زراعی شوند. گیاهان، واکنش‌های مختلفی را در برابر این تنش‌ها در سطح مولکولی، سلولی و گیاه کامل از خود نشان می‌دهند. این واکنش‌ها ممکن است منجر به افزایش تحمل به تنش‌ها شوند. شناسایی ژن‌هایی که این ویژگی‌ها را کنترل می‌کند و این که چگونه این ژن‌ها و محصولات آنها تنظیم می‌شوند برای اصلاح یا مهندسی ژنتیک تحمل گیاه به تنش ضرورت دارد (Samizadeh-Lahiji and Edrisi-Marian, 2013).

به بهبود ارقام متحمل به خشکی، به روش‌های ژنتیکی و به‌نژادی برای بهبود ارقام نیاز است. لذا در تحقیق حاضر از رگه‌های خویش آمیخته نوترکیب که یکی از ارزشمندترین بسترهای ارزیابی پژوهش‌های به‌نژادی می‌باشد استفاده شد و نشانگرهای مرتبط با صفات زراعی و عملکرد دانه، تحت تنش خشکی مورد شناسایی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و آزمایش مزرعه‌ای

در آزمایش حاضر تعداد ۴۰ رگه خویش آمیخته برنج منتخب از نسل نهم (F9) به همراه والدین جمعیت شامل رقم ایرانی شاه‌پسند و IR28 مورد بررسی قرار گرفت. قابل ذکر است این دو والد از نظر بسیاری از صفات مرتبط با تحمل به تنش‌های غیرزیستی به‌ویژه شوری و خشکی تفاوت‌های قابل توجهی دارند (Sabouri *et al.*, 2007). این آزمایش در مزرعه تحقیقاتی مؤسسه تحقیقات برنج کشور (رشت) با ۳۷ درجه و ۱۶ دقیقه طول جغرافیایی و عرض ۴۹ درجه و ۶۳ دقیقه در بهار و تابستان ۱۳۹۷ در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار، در دو شرایط بدون تنش و تحت تنش خشکی اجرا شد. مواد گیاهی ابتدا در خزانه پرورش یافتند. هم‌زمان، زمین اصلی شخم زده شد و پس از تسطیح، زمین اصلی به دو قسمت مساوی تقسیم شد. یک قسمت به محیط بدون تنش و یک قسمت به تیمار تنش خشکی اختصاص داده شد. انتقال نشاءها به زمین اصلی در مرحله ۳-۴ برگی انجام شد و فاصله خطوط کاشت ۲۵ در ۲۵ سانتی‌متر برای کلیه رگه‌ها در نظر گرفته شد. عملیات کاشت برای هر دو محیط یکسان و به صورت دستی انجام شد. با در نظر گرفتن حاشیه هر کرت، هر رگه در یک کرت با مساحت ۲/۵ مترمربع و با فاصله ۵۰ سانتی‌متر از یکدیگر قرار گرفتند. در قسمت بدون تنش، گیاهان در طول

اینکه برنج به طور طبیعی خودگشن است و زمان موردنیاز برای تولید نسل آن کم است، جهت تولید جمعیت رگه‌های خویش آمیخته نوترکیب مناسب است (McCouch and Doerge, 1995).

در روش‌های به‌نژادی و تولید ارقام پرمحصول انتخاب صحیح والدین امری حساس و با اهمیت است (Navabpour and Haddad, 2011). از آنجا که اکثر صفات مهم مورفولوژیک و فیزیولوژیک مؤثر بر عملکرد، کمی هستند و بلوک‌های ژنی در بروز آنها نقش دارند، ژنتیک کلاسیک نمی‌تواند نحوه رفتار ژن‌های کنترل‌کننده صفات کمی را به صورت ژن‌های مجزا مورد بررسی قرار دهد. با پیشرفت تکنولوژی نشانگرهای مولکولی، نرم‌افزارهای مکان‌یابی ژن‌های کنترل‌کننده صفات کمی و تهیه نقشه پیوستگی، ابزارهای قدرتمندی جهت بررسی مولکولی صفات کمی فراهم شده است (El Rabey *et al.*, 2013). شناسایی QTL‌های کنترل‌کننده صفات کمی می‌تواند به فهم کنترل ژنتیکی آنها و توسعه استراتژی‌های گزینش به کمک نشانگر کمک نماید (Julio *et al.*, 2006). بعبارتی استفاده از مکان‌های ژنی (QTLs) کنترل‌کننده عملکرد دانه تحت تنش خشکی، باعث بالارفتن کارایی ارقام برنج متحمل به خشکی می‌شود (Vikram *et al.*, 2012). Sabouri و همکاران (۲۰۱۹) رگه‌های خویش آمیخته برنج (F7) را از لحاظ تحمل به خشکی بر اساس شاخص‌های تحمل و با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره بررسی نمودند. آنها ضمن شناسایی چند رگه متحمل نسبت به خشکی، با استفاده از تجزیه ارتباطی دریافتند نشانگرهای ریزماهواره RM2091، RM302، RM231، RM7 و RM19367 ارتباط معنی‌داری با شاخص‌های حساسیت و تحمل دارند و در زمینه ژنتیکی تحقیق مورد نظر از اهمیت ویژه‌ای برخوردارند.

با توجه به اهمیت گیاه برنج و نیاز جامعه امروزی

آزمایش، به صورت طبیعی از آب کافی برخوردار بودند و در قسمت تحت تنش، حدود ۶۰ روز پس از نشاء، یعنی در پایان مرحله رشد رویشی و قبل از وارد شدن به مرحله زایشی، آبیاری قطع گردید و تا پایان دوره و زمان برداشت محصول، گیاهان تحت تنش خشکی قرار گرفتند. همچنین برای هدایت آب از داخل مزرعه به حاشیه، زهکش‌هایی به عمق ۵۰ سانتی‌متر حفر شد. پس از مرحله رسیدگی، با توجه به ماهیت یکنواختی رگه‌های خویش‌آمیخته در هر کرت، تعداد سه بوته از هر کرت به‌طور تصادفی انتخاب و ۱۵ صفت زراعی و عملکردی شامل تعداد پنجه‌های بارور، تعداد کل پنجه، وزن خوشه‌ها، طول خوشه، میزان خروج خوشه از غلاف، طول برگ پرچم، عرض برگ پرچم، تعداد خوشچه، تعداد دانه بارور در خوشه، تعداد دانه پوک، تعداد دانه کل در خوشه، وزن دانه بارور خوشه، روز تا گلدهی، ارتفاع بوته و دمای برگ بر اساس روش اندازه‌گیری استاندارد صفات برنج (SES, 2005) اندازه‌گیری شد. همچنین به‌منظور تخمین صحیح‌تر صفت عملکرد دانه، بعد از حذف حاشیه، از کلیه بوته‌های کرت استفاده شد.

استخراج DNA و انجام PCR

به‌منظور استخراج DNA، نمونه‌های برگ گیاهان سالم در مرحله پنجه‌زنی از بوته‌های برنج در قسمت بدون تنش تهیه شد. استخراج DNA به‌روش CTAB (Saghai Maroof *et al.*, 1994) انجام و سپس کمیّت و کیفیت نمونه‌های استخراجی به‌ترتیب با استفاده از اسپکتوفتومتر و ژل آگارز یک درصد تعیین شد.

واکنش زنجیره پلی‌مراز

ابتدا تعداد بیش از ۱۱۰ نشانگر ریزماهواره و

EST-SSR^۱ که از منابع مختلف و پایگاه داده گرامینه شناسایی شده بودند، مورد ارزیابی والدینی (بین دو والد شاه‌پسند و IR28) قرار گرفتند. از این تعداد، ۴۱ نشانگر چندشکلی مناسبی نشان دادند و از آنها برای تعیین ژنوتیپ کلیه افراد جمعیت استفاده شد. اطلاعات آغازگرهای مذکور از مقالات و پایگاه گرامینه (www.gramene.org) استخراج گردید که در جدول ۱ ارائه شده است. سپس اجزای واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در حجم ۱۰ میکرولیتر، با اجزای ۲ میکرولیتر DNA، ۵ میکرولیتر آب استریل دیونیزه، ۱ میکرولیتر بافر PCR (10X)، ۰/۴۸ میکرولیتر کلرید منیزیم، ۰/۶ میکرولیتر dNTP، ۰/۴ میکرولیتر از هر آغازگر با غلظت ۶۰ نانوگرم در میکرولیتر، ۰/۱۲ میکرولیتر آنزیم Taq polymerase (۵ واحد در میکرولیتر) تهیه شد. چرخه‌های حرارتی PCR شامل یک چرخه واسرشته سازی به مدت ۴ دقیقه در دمای ۹۴ درجه سلسیوس، سپس ۱۰ چرخه شامل ۴۰ ثانیه در دمای ۹۴ درجه سلسیوس، ۴۰ ثانیه در دمای ۶۵ درجه سلسیوس (با کاهش هر یک درجه سلسیوس برای رسیدن به دمای اتصال) و یک دقیقه دمای ۷۲ درجه سلسیوس بود. سپس ۲۶ چرخه که شامل ۴۰ ثانیه در دمای ۹۴ درجه سلسیوس، ۴۰ ثانیه در دمای ۵۵ درجه سلسیوس و یک دقیقه در دمای ۷۲ درجه سلسیوس بود و در نهایت یک چرخه بسط نهایی به مدت پنج دقیقه در دمای ۷۲ درجه سلسیوس بود که با استفاده از دستگاه ترموسایکلر BIO RAD مدل GeneAtlas Type-E ساخت کشور ژاپن در آزمایشگاه ژنومیکس دانشکده علوم کشاورزی دانشگاه گیلان صورت گرفت. تفکیک نوار-های تکثیری در دستگاه الکتروفورز افقی با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز ۲ درصد، با ولتاژ ۷۵ ولت انجام گرفت. در نهایت نمونه‌ها بر اساس ژنوتیپ والدین (A یا B)، تعیین ژنوتیپ شد.

1. EST-SSR (Expressed Sequence Tag-derived Simple Sequence Repeat)

جدول ۱. نام و مشخصات نشانگرهای SSR و EST-SSR برنج استفاده شده در این تحقیق

شماره Number	نام Name	شماره کروموزوم Chr. Number	توالی پیش رو Forward	توالی معکوس Revers
1	RM7	3	TTCGCCATGAAGTCTCTCG	CCTCCCATCATTTTCGTTGTT
2	RM190	6	CTTTGTCTATCTCAAGACAC	TTGCAGATGTTCTTCTCTGATG
3	RM212	1	CCACTTTCAGCTACTACCAG	CACCATTTGTCTCTCATTATG
4	RM231	3	CCAGATTATTTCTGAGGTC	CACTTGCATAGTTCTGCATTG
5	RM302	1	TCATGTCATCTACCATCACAC	ATGGAGAAGATGGAATACTTGC
6	RM431	1	TCCTGCGAACTGAAGAGTTG	AGAGCAAAACCCTGGTTCAC
7	RM493	1	TAGCTCCAACAGGATCGACC	GTACGTAACCGCGGAAGGTG
8	RM510	6	AACCGGATTAGTTTCTCGCC	TGAGGACGACGAGCAGATTTC
9	RM3805	6	AGAGGAAGAAGCCAAGGAGG	CATCAACGTACCAACCATGG
10	RM12091	1	CTGCAAATGCACAGGAATCAGG	TCCTCTCGCTTTTCTTCTCTCC
11	RM19367	6	CGTCATGTGCGGAGGTAAGC	AGGCGTACGTGGAGCAGAGTGC
12	RMES5-1*	5	TATGATAGCGCCTTCGGAGT	GAGATTAACGTGCGCTCCTC
13	RMES6-1*	6	CTGCCACCGGTGTAGCTAGT	TGGCCCCATCGTATATGAAC
14	RMES9-2*	9	CCACGTTGATAAGCTCATTGC	TGGGCACCGAAAATAAAAATC
15	RMES10-1*	10	CAGGGGGTACGTCTACAAGG	TATACCCGGCGAAATACGTC
16	RM6697	7	GCAAGATCCAGTCGATTTGG	ATAACATGAGCATCTCCCCG
17	RM1384	8	TTAATCCATCCTGTAGCTGG	TCGCTATCAACACTACCTGC
18	RM5493	8	GACAAAACACAAAGCAGGAC	TAACAAACCAACCAACCAAG
19	RM3496	8	AATGTGGACTAGCTGCCTGC	GTACCGGTATACGGCCCTTC
20	RM10748	1	CATCGGTGACCACCTTCTCC	CCTGTCATCTATCTCCCTCAAGC
21	RM10772	1	GCACACCATGCAAATCAATGC	CAGAAACCTCATCTCCACCTTCC
22	RM10825	1	GGACACAAGTCCATGATCCTATCC	GTTTCTTTCCATCCTTGTGTC
23	RM1082	1	TCATCCGTGGAGCAAGGAGAGG	CCTAGCTAATTGGAGTCCGGGTTGG
24	RM10843	1	CACCTCTTCTGCCTCCTATCATGC	GTTTCTTTCGCGAAATCGTGTGG
25	RM10864	1	GAGGTGAGTGAGACTTGACAGTGC	GCTCATCTCAACCAACCAAGTCC
26	RM10871	1	TGAGGCTGTAACGTAGACGATAACC	AAGCCTGTAGAGAGGCCCAACC
27	RM10890	1	GCTTCGGCTCTTCATCACTGG	GCGATTATAGGAGCGCTATGTGG
28	RM12146	1	AGTATGCCCTGCCACTACACTAGG	CAGCGAATGGCAAGAGCAACC
29	RM1287	1	GTGAAGAAAGCATGGTAAATG	CTCAGCTTGCTGTGGTTAG
30	RM16030	3	GCGAACTATGAGCATGCCAACC	GGATTACCTGGTGTGTGCAGTGTCC
31	RM273	4	GAAGCCGTCGTGAAGTTACC	GTTTCTACCTGATCGCGAG
32	RM304	10	TCAAACCGGCACATATAAGAC	GATAGGGAGCTGAAGGAGATG
33	RM452	2	CTGATCGAGAGGTTAAGGG	GGGATCAAACCAAGCTTTCTG
34	RM488	1	CAGCTAGGGTTTTGAGGCTG	TAGCAACAACCAAGCGTATGC
35	RM497	2	TCCTCTTACCTATGGGTGG	GCCAGTGCTAGGAGAGTTGG
36	RM521	2	TTCCCTTATTCCTGCTCTCC	GGGATTTGCAGTGAGCTAGC
37	RM315	1	GAGGTACTTCCCTCCGTTTCAC	AGTCAGCTCACTGTGCAGTG
38	RM279	2	GCGGGAGAGGGATCTCCT	GGCTAGGAGTTAACCTCGCG
39	RM211	2	CCGATCTCATCAACCAACTG	CTTACGAGGATCTCAAAGG
40	RM468	3	CCCTTCCTGTGTGGCTAC	TGATTCTGAGAGGCCAACC
41	RM589	6	ATCATGGTCGGTGGCTTAAC	CAGGTTCCAACCAAGACTG

* نشانگرهای EST-SSR با ستاره مشخص شده‌اند.

شناسایی ژن‌های مهم در نواحی ژنومی شناسایی شده مرتبط با صفات جایگاه فیزیکی نشانگرهای مورد مطالعه در ژنوم برنج با استفاده از پایگاه داده‌های Gramene (Monaco et al., 2013) و Ricebase (Edwards et al., 2016) دریافت شد. اطلاعات از طریق Genome Browser پایگاه داده Ensembl Plants (Bolser et al., 2016) برای شناسایی نزدیک‌ترین ژن‌های بالادست (Upstream) و پایین‌دست (Downstream) به جایگاه نشانگر هدف استفاده شد. در مواردی که نشانگر بخشی از یک ژن بود، ژن مورد نظر (In frame) نیز انتخاب شد. برای دریافت اطلاعات مربوط به ژن‌های شناسایی شده از پایگاه داده RGAP7 استفاده شد (Kawahara et al., 2013) و طی آن برای هر ژن جایگاه کروموزومی، اسم لوکوس، اسم ژن (در صورت موجود بودن) و

شناسایی ژن‌های مهم در نواحی ژنومی شناسایی شده مرتبط با صفات جایگاه فیزیکی نشانگرهای مورد مطالعه در ژنوم برنج با استفاده از پایگاه داده‌های Gramene (Monaco et al., 2013) و Ricebase (Edwards et al., 2016) دریافت شد. اطلاعات از طریق Genome Browser پایگاه داده Ensembl Plants (Bolser et al., 2016) برای شناسایی نزدیک‌ترین ژن‌های بالادست

نشانگر RMES6-1 مرتبط با میزان خروج خوشه از غلاف (۲۸/۱ درصد) اختصاص داشت. وجود ضریب تبیین بالا برای مدل‌های رگرسیونی بین نشانگرها با صفات زراعی می‌تواند بیانگر ارتباط نزدیک آغازگرها با صفات باشد. به همین جهت این نشانگرها می‌توانند گزینه مناسبی برای انتخاب به کمک نشانگر در پروژه‌های به‌نژادی باشند. همچنین بیش‌ترین ضریب رگرسیون در شرایط بدون تنش مربوط به عملکرد دانه (۰/۷۲۲) و در شرایط تنش خشکی مربوط به طول برگ پرچم (۰/۵۸۷) بود. در پژوهش تجزیه ارتباطی Azizi و همکاران (۲۰۱۷) که در آن ۱۲۱ لاین و رقم مختلف برنج با ۲۵ نشانگر ریزماهواره مورد ارزیابی قرار گرفت، صفات طول شلتوک (۰/۲۸) و عملکرد دانه (۰/۲۳) بالاترین ضریب تبیین را به خود اختصاص دادند.

در این پژوهش در شرایط بدون تنش و تحت تنش خشکی نشانگرهایی یافت شدند که به طور مشترک با چندین صفت ارتباط معنی‌داری داشتند. در شرایط بدون تنش، نشانگر RM211 با شش صفت (طول خوشه، طول برگ پرچم، تعداد دانه بارور در خوشه، تعداد دانه پوک، تعداد دانه کل در خوشه و وزن دانه بارور در خوشه)، ارتباط معنی‌دار داشت. شایان ذکر است شناسایی نشانگرهای مرتبط با چندین صفت مهم با توجه به نقش آنها در پیوستگی با QTL‌های کنترل‌کننده صفات مختلف از اهمیت بیشتری در مقایسه با نشانگرهای دیگر برخوردار است و می‌تواند در برنامه‌های به‌نژادی، کاربردی باشد. زیرا می‌توان هم‌زمان چند صفت را گزینش نمود. به همین علت شناسایی چنین نشانگرهایی در به‌نژادی گیاهی بسیار حائز اهمیت است (Tuberosa *et al.*, 2002). علاوه بر این، RM279، RM6697 و RM19367 با پنج صفت (طول خوشه، طول برگ پرچم، تعداد دانه بارور در خوشه، تعداد دانه کل در خوشه و وزن دانه بارور در خوشه)، (وزن خوشه‌ها، طول برگ پرچم، تعداد دانه بارور در خوشه، وزن دانه

توضیحات کارکرد ژن (در صورت وجود) دریافت گردید. بررسی بیان ژن‌های شناسایی‌شده اختصاصی شرایط بدون تنش و تنش خشکی با استفاده از داده‌های RNA-seq پایگاه‌داده RED (Xia *et al.*, 2017) بررسی شد. داده‌های بیانی به \log_2 (FPKM+1) تبدیل شده و نقشه حرارتی با نرم افزار TBtools رسم شد (Chen *et al.*, 2018).

تجزیه‌های آماری

به‌منظور تعیین نشانگرهای معنی‌دار مرتبط با صفات فنوتیپی ارزیابی شده در جمعیت در پژوهش حاضر، تجزیه رگرسیون گام به گام بین نشانگرهای چندشکل و صفات انجام گرفت. با این توضیح که آلل‌های مربوط به آغازگرها به عنوان متغیر مستقل و صفات مورد مطالعه به عنوان متغیر وابسته در نظر گرفته شد. این تجزیه با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۲۴ (IBM Crop, 2016) انجام شد.

نتایج و بحث

نتایج تجزیه رگرسیون گام به گام و همچنین اطلاعات ژن‌های شناسایی‌شده در این پژوهش در شرایط بدون تنش و تنش خشکی به‌ترتیب در جدول‌های ۲ تا ۵ ارائه شده است.

طبق نتایج تجزیه رگرسیون نشانگرهای مرتبط با صفات، از ۴۱ نشانگر مورد استفاده در این پژوهش، تحت شرایط بدون تنش ۲۴ و در شرایط تنش خشکی ۲۲ نشانگر معنی‌دار شناسایی شدند. در شرایط بدون تنش، صفات طول برگ پرچم، تعداد دانه بارور در خوشه، عملکرد دانه، و در شرایط تحت تنش، صفت میزان خروج خوشه از غلاف در ارتباط با شش نشانگر بیش‌ترین تعداد نشانگرهای آگاهی-بخش را نشان دادند.

بیش‌ترین ضریب تبیین (R^2) در شرایط بدون تنش به RM3496 مرتبط با صفت تعداد روز تا گلدهی (۲۴/۸ درصد) و در شرایط تنش خشکی به

توسط Venuprasad و همکاران (۲۰۱۲) در سه زمینه ژنتیکی Apo/Swarna، Apo/IR72، Vandana/IR72 انجام شد، که نشانگر RM19367 را در نزدیکی یک QTL بزرگ اثر qDTY6.1 بر روی عملکرد تحت تنش خشکی معرفی نمودند. البته در سایر کروموزم‌ها نیز QTL‌هایی برای عملکرد شناسایی شده است. در مطالعه (Baisakh *et al.*, 2020)، با استفاده از یک جمعیت F2:3 مشتق از ارقام Cocodrie (حساس به خشکی) و Nagina 22 (متحمل به خشکی)، هشت QTL برای عملکرد در شرایط تنش خشکی شناسایی شد. یک QTL شناسایی شده بر روی کروموزوم ۱ با توجیه ۱۱/۱۵٪ از تغییرات فنوتیپی عملکرد، با QTL شناسایی شده صفت تعداد خوشه هم‌مکان بود و توانست ۳۷/۷٪ از تغییرات فنوتیپی این صفت را توجیه کند. آنها اظهار داشتند شناسایی QTL‌های کنترل‌کننده مرتبط با عملکرد برای بالا بردن کارایی‌گزینه‌ش و انتخاب بسیار حایز اهمیت می‌باشند. در خصوص صفات طول خوشه، طول برگ پرچم، تعداد دانه بارور در خوشه، تعداد دانه پوک و تعداد دانه کل در خوشه در شرایط بدون تنش به ترتیب ۸/۲، ۲۰/۵، ۶/۷، ۱۱/۴ و ۱۹/۹ درصد از تغییرات صفات و در شرایط تحت تنش برای صفات میزان خروج خوشه از غلاف، طول برگ پرچم، تعداد دانه پوک، تعداد دانه کل در خوشه به ترتیب ۳/۵، ۲۸، ۱۸/۵ و ۱۴ درصد توسط نشانگر RM211 توجیه شد. صفات وزن خوشه‌ها، طول برگ پرچم، تعداد دانه بارور در خوشه، وزن دانه بارور خوشه، عملکرد دانه در شرایط بدون تنش به ترتیب ۱۶/۱، ۹/۱، ۱۱/۱، ۱۵/۵ و ۱۸/۴ درصد از تغییرات و در شرایط تنش خشکی برای صفات طول برگ پرچم و تعداد دانه کل در خوشه به ترتیب ۵/۹ و ۱۰/۶ درصد از تغییرات، توسط نشانگر RM279 توجیه شد.

بارور خوشه و عملکرد دانه) و (وزن خوشه‌ها، میزان خروج خوشه از غلاف، تعداد دانه بارور در خوشه، وزن دانه بارور خوشه و عملکرد دانه) و RM10772 در شرایط بدون تنش با چهار صفت (وزن خوشه‌ها، تعداد دانه پوک، تعداد دانه کل در خوشه و عملکرد دانه) ارتباط معنی‌دار داشتند.

در شرایط تنش نیز نشانگر RM6697، هم‌زمان با پنج صفت (طول خوشه، طول برگ پرچم، تعداد دانه بارور در خوشه، تعداد دانه کل در خوشه و وزن دانه بارور) ارتباط معنی‌دار نشان داد. علاوه بر این، نشانگرهای RM10772، RM19367 و RM211 هر کدام در ارتباط معنی‌دار با چهار صفت در رده بعدی قرار گرفتند.

با توجه به جداول ۲ و ۳ و بنابر نتایج تجزیه رگرسیون گام به گام، نشانگر RM19367 به عنوان نشانگر مشترک در شرایط بدون تنش برای صفات وزن خوشه‌ها، میزان خروج خوشه از غلاف، تعداد دانه بارور در خوشه، وزن دانه بارور خوشه و عملکرد دانه به ترتیب ۶/۴، ۵/۶، ۷/۳، ۶/۷ و ۶/۳ درصد از تغییرات صفات و در شرایط تنش خشکی برای صفات ارتفاع بوته، وزن خوشه‌ها، دمای برگ و عملکرد دانه به ترتیب ۱۰/۹، ۷/۸، ۱۲/۱ و ۸/۷ درصد از تغییرات صفات را توجیه نمود. در تنش خشکی نشانگر RM12091 برای صفات تعداد پنجه کل، وزن خوشه‌ها و عملکرد دانه به ترتیب ۶/۷، ۷/۷ و ۵ درصد از تغییرات فنوتیپی را تبیین کرد.

در پژوهش Sabouri و همکاران (۲۰۱۹)، مشخص شد ۵۱/۴٪ از تغییرات عملکرد دانه برنج تحت تنش خشکی توسط نشانگرهای RM7، RM231، RM302، RM12091 و RM19367 توجیه شدند. از بین این نشانگرها، دو نشانگر RM12091 و RM19367 در توجیه عملکرد دانه در شرایط تنش خشکی معنی‌دار شناسایی شدند که می‌تواند نشان‌دهنده اهمیت این نشانگرها باشد. از سوی دیگر در بررسی که

جدول ۲. ضریب تبیین و ضریب رگرسیون استاندارد شده بین هر یک از صفات زراعی و عملکرد دانه با نشانگرهای مولکولی در جمعیت رگه‌های خویش آمیخته نوترکیب برنج (F₉) در شرایط بدون تنش

متغیر وابسته	نشانگر معنی‌دار	ضریب رگرسیونی استاندارد شده (B)	ضریب تبیین تصحیح شده Adjusted R ²	سطح معنی‌داری
تعداد پنجه بارور	RM1287	-0.638	0.123	0.000
	RM10871	0.291	0.127	0.017
	RM7	0.407	0.105	0.001
	RMES10-1	0.376	0.076	0.005
	RM10829	-0.329	0.102	0.006
تعداد پنجه کل	RM431	0.431	0.165	0.005
وزن خوشه‌ها	RM279	0.642	0.161	0.000
	RM10829	0.422	0.086	0.001
	RMES6-1	0.485	0.098	0.000
	RM19367	-0.315	0.064	0.012
	RM10772	-0.249	0.014	0.043
طول خوشه	RM6697	0.455	0.135	0.003
	RM211	0.321	0.082	0.032
میزان خروج خوشه از غلاف	RMES6-1	-0.501	0.186	0.000
	RM273	0.442	0.077	0.001
	RM212	0.564	0.064	0.000
	RM493	0.344	0.090	0.006
	RM19367	-0.439	0.056	0.001
طول برگ پرچم	RM211	0.512	0.205	0.000
	RM6697	0.341	0.138	0.004
	RM279	0.443	0.091	0.000
	RM212	-0.331	0.102	0.006
	RMES5-1	0.307	0.088	0.008
تعداد خوشچه	RM3496	0.526	0.184	0.000
	RM304	-0.376	0.122	0.009
تعداد دانه بارور در خوشه	RM1384	-0.296	0.082	0.016
	RM6697	0.477	0.107	0.000
	RM279	0.422	0.111	0.001
	RM211	0.421	0.067	0.002
	RM190	0.312	0.059	0.012
	RM19367	-0.305	0.073	0.020
	RM211	0.476	0.114	0.001
تعداد دانه پوک	RM10772	0.572	0.152	0.000
	RM468	-0.364	0.093	0.008
	RMES9-2	0.277	0.065	0.031
	RM211	0.593	0.199	0.000
تعداد دانه کل در خوشه	RM6697	0.357	0.088	0.010
	RM10772	0.295	0.070	0.031
	RM279	0.528	0.155	0.000
وزن دانه بارور در خوشه	RM6697	0.563	0.129	0.000
	RM211	0.445	0.075	0.001
	RM19367	-0.358	0.067	0.009
	RM468	0.282	0.050	0.045
	RM3496	0.425	0.248	0.004
تعداد روز تا ۵۰ درصد گلدهی	RM510	0.311	0.072	0.031
	RM279	0.722	0.184	0.000
عملکرد دانه	RM10829	-0.482	0.092	0.000
	RMES6-1	0.479	0.093	0.000
	RM10772	-0.399	0.045	0.001
	RM19367	-0.311	0.063	0.007
	RM190	0.264	0.002	0.018

جدول ۳. ضریب تبیین و ضریب رگرسیون استاندارد شده بین هر یک از صفات زراعی و عملکرد دانه با نشانگرهای مولکولی در جمعیت رگه‌های خویش آمیخته نوترکیب برنج (F₉) در شرایط تنش خشکی

متغیر وابسته	نشانگر معنی‌دار	ضریب رگرسیونی استاندارد شده (B)	ضریب تبیین تصحیح شده Adjusted R ²	سطح معنی‌داری
ارتفاع بوته	RM19367	-0.420	0.109	0.007
	RM273	0.313	0.075	0.040
تعداد پنجه بارور	RM10829	-0.384	0.168	0.006
	RM589	-0.332	0.076	0.017
	RM10772	-0.323	0.091	0.019
تعداد پنجه کل	RM431	0.391	0.196	0.009
	RM12091	0.299	0.067	0.042
وزن خوشه‌ها	RM10843	-0.376	0.106	0.011
	RM19367	-0.349	0.078	0.018
	RM12091	0.308	0.077	0.034
طول خوشه	RM6697	0.374	0.117	0.017
	RMES6-1	-0.434	0.281	0.001
میزان خروج خوشه از غلاف	RM211	-0.431	0.035	0.000
	RM273	0.405	0.086	0.002
	RMES10-1	0.251	0.051	0.041
	RM190	0.267	0.049	0.021
	RM10772	-0.243	0.043	0.049
	RM211	0.587	0.280	0.000
طول برگ پرچم	RM6697	0.409	0.098	0.001
	RM302	0.293	0.072	0.014
	RM279	0.263	0.059	0.027
	RM10748	-0.460	0.115	0.004
عرض برگ پرچم	RM497	-0.338	0.088	0.028
	RM3496	0.404	0.083	0.008
تعداد خوشچه	RM304	-0.398	0.135	0.009
	RM6697	0.339	0.092	0.032
تعداد دانه پوک	RM211	0.552	0.185	0.006
	RM10772	0.550	0.133	0.006
	RM468	-0.354	0.085	0.006
	RMES9-2	0.332	0.103	0.006
تعداد دانه کل در خوشه	RM211	0.511	0.140	0.000
	RM6697	0.405	0.083	0.003
	RM279	0.331	0.106	0.013
	RM10772	0.290	0.070	0.029
وزن دانه پر	RM6697	0.383	0.081	0.013
	RM279	0.358	0.107	0.019
دمای برگ	RM19367	0.441	0.121	0.004
	RM488	0.366	0.114	0.014
تعداد روز تا ۵۰ درصد گلدهی	RM3496	0.401	0.278	0.006
	RMES6-1	0.357	0.093	0.014
عملکرد دانه	RM10843	-0.425	0.138	0.004
	RM19367	-0.355	0.087	0.015
	RM12091	0.260	0.050	0.068

عملکرد گیاه در هر دو شرایط تنش و بدون تنش خشکی نشان دادند. آنها اظهار داشتند این اطلاعات می‌تواند برای بهبود عملکرد گیاه تحت هر دو شرایط تنش خشکی و بدون تنش در برنامه‌های به‌نژادی مفید باشد.

نشانگر RM279 در تحقیق Tabkhkar و همکاران (۲۰۱۸) که با استفاده از ۸۳ رقم برنج و ۳۴ نشانگر پیوسته با QTL‌های مرتبط با عملکرد دانه (qDTYs) تحت تنش خشکی صورت گرفت، دو نشانگر RM231 و RM166 ارتباط معنی‌داری با

دوسال پیوستگی معنی‌دار با صفات نشان داد. آنها در این پژوهش دریافتند پیوستگی بالا نشانگرها، انتخاب به کمک نشانگر و استخراج الل‌های صفات مهم در ژرم‌پلاسم را تسهیل می‌نماید. نشانگر RM212 برای صفات میزان خروج خوشه از غلاف و طول برگ پرچم در شرایط بدون تنش به ترتیب $6/4$ و $10/2$ درصد از تغییرات صفات را توجیه نمود.

در شرایط تنش خشکی نشانگر RM273 برای صفات ارتفاع بوته و میزان خروج خوشه از غلاف به ترتیب $7/5$ و $8/6$ درصد از تغییرات را توجیه نمود. در تحقیق Nei و همکاران (۲۰۱۵) که به منظور مکان یابی صفات کمی در برنج تحت تنش خشکی با استفاده از جمعیتی شامل ۱۰۵ رگه که حاصل تلاقی بین Zhenshan97B و Zhenshan97B×IRAT10 بودند صورت گرفت، سه QTL بزرگ اثر بر صفات طول خوشه، تعداد خوشچه، تعداد سنبلچه در هر خوشه در حد فاصل بین نشانگرهای RM273-RM255، بر روی کروموزوم ۴، شناسایی شد. نشانگر RM10843 در شرایط تنش برای صفات وزن خوشه‌ها و عملکرد دانه به ترتیب $10/6$ و $13/8$ درصد، از تغییرات صفات را توجیه نمودند. نشانگرها و QTL‌هایی بزرگ‌اثر و اقتصادی که در زمینه‌های مختلف ژنتیکی به تایید می‌رسند در برنامه‌های به‌نژادی مثل انتقال به وسیله تلاقی برگشتی به کمک نشانگرها مورد استفاده قرار می‌گیرند. اخیراً Muthu و همکاران (۲۰۲۰)، برای بهبود ارقام متحمل به تنش‌های غیر زیستی، از هرمنبندی QTL‌های بزرگ‌اثر استفاده کردند. آنها با استفاده از روش به نژادی، تلاقی برگشتی به کمک نشانگر، QTL‌های بزرگ‌اثر مرتبط با تحمل به خشکی (qDTY2.1 و qDTY1.1)، شوری (Saltol) و ماندابی (Sub1) را به رقم بهبودیافته White Ponni منتقل نمودند.

شناسایی ژن‌ها در دو شرایط بدون تنش و تحت تنش خشکی

نشانگر RM10772 در شرایط بدون تنش برای صفات وزن خوشه‌ها، تعداد دانه پوک، تعداد دانه کل در خوشه و عملکرد دانه به ترتیب $1/4$ ، $15/2$ ، 7 و $4/5$ درصد و شرایط تحت تنش برای صفات تعداد پنجه بارور، میزان خروج خوشه از غلاف، تعداد دانه پوک، تعداد دانه کل در خوشه به ترتیب $9/1$ ، $4/3$ ، $13/3$ و 7 درصد، از تغییرات را توجیه نمود. در شرایط بدون تنش نشانگر RM6697 به طور مشترک در صفات طول خوشه، طول برگ پرچم، تعداد دانه بارور در خوشه، تعداد دانه کل در خوشه به ترتیب $13/5$ ، $13/8$ ، $10/7$ و $8/8$ درصد و در شرایط تحت تنش برای صفات طول خوشه، تعداد دانه بارور در خوشه و تعداد دانه کل در خوشه به ترتیب $11/7$ ، $9/2$ و $8/3$ درصد از تغییرات صفات را توجیه نمود. نشانگر RM10829 به طور مشترک در صفات تعداد پنجه بارور، وزن خوشه‌ها، عملکرد دانه به ترتیب $10/2$ ، $8/6$ و $9/2$ درصد از توجیه تغییرات صفات را در شرایط بدون تنش به خود اختصاص داد. نشانگر RMES6-1 برای صفات وزن خوشه‌ها، میزان خروج خوشه از غلاف و عملکرد دانه در شرایط بدون تنش به ترتیب $9/8$ ، $18/6$ و $9/3$ درصد و در شرایط تنش برای صفات میزان خروج خوشه از غلاف و روز تا 50 درصد گلدهی به ترتیب $28/1$ و $9/3$ درصد، نشانگر RM468 برای صفات تعداد دانه پوک و وزن دانه بارور خوشه به ترتیب $9/3$ و 5 درصد، نشانگر RM3496 برای صفات تعداد خوشچه و تعداد روز تا 50 درصد گلدهی در شرایط بدون تنش به ترتیب $18/4$ و $24/8$ درصد و شرایط تحت تنش برای صفات تعداد خوشچه و تعداد روز تا 50 درصد گلدهی به ترتیب $8/3$ و $27/8$ درصد، نشانگر RM190 برای صفات تعداد دانه بارور در خوشه و عملکرد دانه توانست به ترتیب $5/9$ و $0/2$ درصد تغییرات فوتوپیی را توجیه نماید. طی تحقیقاتی که توسط Oliveira Borba و همکاران (۲۰۱۰) بر روی نقشه پیوستگی برای عملکرد و صفت کیفیت دانه با استفاده از ۸۶ نشانگر SSR و در دو سال کشت در مزرعه انجام گرفت، نشانگر RM190 در هر

تحت تنش و بدون تنش توسط نشانگرهای مورد استفاده شناسایی شدند که اطلاعات ژن‌های شناسایی شده بر روی کروموزوم‌های ۱، ۲، ۴، ۶، ۷، ۸ و ۱۰ در جدول‌های ۴ و ۵ ارائه شده است.

شناسایی ژن‌ها با استفاده نشانگرهای معنی‌دار در شرایط تحت تنش خشکی انجام شد و در این پژوهش طی بررسی‌های بیوانفورماتیکی، ژن‌ها در بالادست، پایین‌دست و قسمتی از ژن در شرایط

جدول ۴. اطلاعات ژن‌های شناسایی شده مرتبط با نشانگرهایی که در پژوهش حاضر با صفات زراعی و عملکرد دانه برنج در شرایط بدون تنش ارتباط معنی‌دار نشان دادند.

صفت	SSR-linked		نام مکان	نام ژن	موقعیت	شرح ژن
وزن خوشه	RM431	UpStream	LOC_Os01g66980	—	Chr1: 38,900,545-38,902,752	Trigger factor ribosome-binding zinc finger, C3HC4 type domain containing protein
		InFrame	LOC_Os01g66970	—	Chr1: 38,893,298-38,897,714	—
		DownStream	LOC_Os01g66960	—	Chr1: 38,891,151-38,894,746	selenoprotein precursor
	RM279	UpStream	LOC_Os02g05850	—	Chr2: 2,887,328-2,892,037	transposon protein
		InFrame	LOC_Os02g05840	<i>VIL2</i>	Chr2: 2,876,553-2,882,177	Vernalization-insensitive protein
		DownStream	LOC_Os02g05830	—	Chr2: 2,874,934-2,876,452	ribulose biphosphate carboxylase small chain
	RM10829	UpStream	LOC_Os01g23705	—	Chr1: 13,342,089-13,342,658	—
		InFrame	****	—	—	—
		DownStream	LOC_Os01g23700	—	Chr1: 13,340,275-13,340,721	—
	RM19367	UpStream	LOC_Os06g05200	—	Chr6: 2,335,680-2,336,297	zinc finger, C3HC4 type domain containing protein, expressed
	InFrame	****	—	—	—	
	DownStream	LOC_Os06g05190	<i>BRCA1</i>	Chr6: 2,329,883-2,334,474	DNA-repair protein	
RM10772	UpStream	LOC_Os01g21680	—	Chr1: 12,163,770-12,164,080	—	
	InFrame	LOC_Os01g21670	—	Chr1: 12,157,455-12,161,768	—	
	DownStream	LOC_Os01g21660	—	Chr1: 12,154,685-12,156,630	—	
طول برگ پرچم	RM211	UpStream	LOC_Os02g04540	—	Chr2: 2020969-2023488	retrotransposon protein
		InFrame	—	—	—	—
		DownStream	LOC_Os02g04530	—	Chr2: 2011707-2018122	rust resistance-like protein RP1
	RM6697	UpStream	LOC_Os07g03120	—	Chr7: 1,194,383-1,195,595	—
		InFrame	—	—	—	—
	DownStream	LOC_Os07g03110	<i>OsFBX213</i>	Chr7: 1,183,280-1,185,666	F-box domain containing Protein	

ادامه جدول ۴. اطلاعات ژن‌های شناسایی شده مرتبط با نشانگرهایی که در پژوهش حاضر با صفات زراعی و عملکرد دانه برنج در شرایط بدون تنش ارتباط معنی‌دار نشان دادند.

صفت	SSR-Linked		نام مکان	نام ژن	موقعیت	شرح ژن
تعداد خوشه	RM279	UpStream	LOC_Os02g05850	—	Chr2: 2,887,328-2,892,037	transposon protein
		InFrame	LOC_Os02g05840	<i>VIL2</i>	Chr2: 2,876,553-2,882,177	Vernalization – insensitive protein
		DownStream	LOC_Os02g05830	—	Chr2: 2,874,934-2,876,452	ribulose biphosphate carboxylase small chain
	RM212	UpStream	LOC_Os01g57220	—	Chr1: 33,059,187-33,065,392	secretory carrier-associated membrane protein
		InFrame	LOC_Os01g57210	<i>katanin p80</i>	Chr1: 33,050,635-33,058,497	WD40 repeat-containing subunit B1 homolog 1
		DownStream	LOC_Os01g57190	—	Chr1: 33,044,180-33,044,803	transposon protein
	RM3496*	UpStream	LOC_Os08g44230	—	Chr8: 27,842,259-27,847,633	zinc finger family protein
		InFrame	—	—	—	—
		DownStream	LOC_Os08g44220	—	Chr8: 27,834,547-27,838,106	GLTP domain containing protein
	RM304	UpStream	LOC_Os10g34940	—	Chr10: 18,656,549-18,657,973	—
	InFrame	—	—	—	—	
	DownStream	LOC_Os10g34930	—	Chr10: 18,640,397-18,641,937	secretory protein	
تعداد دانه در خوشه	RM211	UpStream	LOC_Os02g04540	—	Chr2: 2020969-2023488	retrotransposon protein
		InFrame	—	—	—	—
		DownStream	LOC_Os02g04530	—	Chr2: 2011707-2018122	rust resistance-like protein RP1
	RM6697*	UpStream	LOC_Os07g03120	—	Chr7: 1,194,383-1,195,595	—
		InFrame	—	—	—	—
	DownStream	LOC_Os07g03110	<i>OsFBX213</i>	Chr7: 1,183,280-1,185,666	F-box domain containing protein	
RM10772	UpStream	LOC_Os01g21680	—	Chr1: 12,163,770-12,164,080	—	

ادامه جدول ۴. اطلاعات ژن‌های شناسایی شده مرتبط با نشانگرهایی که در پژوهش حاضر با صفات زراعی و عملکرد دانه برنج در شرایط بدون تنش ارتباط معنی‌دار نشان دادند.

شرح ژن	موقعیت	نام ژن	نام مکان	SSR-Linked	صفت
	Chr1: 12,157,455-12,161,768	-	LOC_Os01g21670	InFrame	گلدی
	Chr1: 12,154,685-12,156,630	-	LOC_Os01g21660	DownStream	
	Chr8: 27,842,259-27,847,633	-	LOC_Os08g44230	UpStream	RM3496*
	-	-	-	InFrame	
	Chr8: 27,834,547-27,838,106	-	LOC_Os08g44220	DownStream	
	Chr6: 2,832,462-2,836,324	-	LOC_Os06g06120	UpStream	RM510
	-	-	-	InFrame	
	Chr6: 2,828,443-2,830,314	-	LOC_Os06g06115	DownStream	
	Chr2: 2,887,328-2,892,037	-	LOC_Os02g05850	UpStream	عملکرد دانه
	Chr2: 2,876,553-2,882,177	<i>VIL2</i>	LOC_Os02g05840	InFrame	
	Chr2: 2,874,934-2,876,452	-	LOC_Os02g05830	DownStream	
	Chr1: 13,342,089-13,342,658	-	LOC_Os01g23705	UpStream	RM10829
	-	-	-	InFrame	
	Chr1: 13,340,275-13,340,721	-	LOC_Os01g23700	DownStream	
	Chr1: 12,163,770-12,164,080	-	LOC_Os01g21680	UpStream	RM10772
	Chr1: 12,157,455-12,161,768	-	LOC_Os01g21670	InFrame	
	Chr1: 12,154,685-12,156,630	-	LOC_Os01g21660	DownStream	
	Chr6: 2,335,680-2,336,297	-	LOC_Os06g05200	UpStream	RM19367
	-	-	-	InFrame	
	Chr6: 2,329,883-2,334,474	<i>BRCA1</i>	LOC_Os06g05190	DownStream	
	Chr6: 1,765,622-1,770,656	-	LOC_Os06g04200	UpStream	RM190
	-	-	-	InFrame	
	Chr6: 1,761,433-1,762,875	-	LOC_Os06g04195	DownStream	

جدول ۵. اطلاعات ژن‌های شناسایی شده مرتبط با نشانگرهایی که در پژوهش حاضر با صفات زراعی و عملکرد دانه برنج در شرایط تنش خشکی ارتباط معنی‌دار نشان دادند.

Gene Description	موقعیت	نام ژن	نام مکان	SSR-linked	صفت
zinc finger C3HC4 type domain containing protein expressed	Chr6: 2335680-2336297	-	LOC_Os06g05200	UpStream	ارتفاع بوته
	-	-	-	InFrame	
DNA-repair protein	Chr6: 2329883-2334474	<i>BRCA1</i>	LOC_Os06g05190	DownStream	تعداد پنجه
Selenium-binding protein	Chr4: 24052947-24054476	-	LOC_Os04g40475	UpStream	
cytochrome P450	Chr4: 24049070-24051142	-	LOC_Os04g40470	InFrame	
cytochrome P450	Chr4: 24043880-24047054	-	LOC_Os04g40460	DownStream	
Trigger factor ribosome-binding zinc finger C3HC4 type domain containing protein	Chr1: 38900545-38902752	-	LOC_Os01g66980	UpStream	وزن خوشه
selenoprotein precursor	Chr1: 38893298-38897714	-	LOC_Os01g66970	InFrame	
	Chr1: 38891151-38894746	-	LOC_Os01g66960	DownStream	
Propylamide-hyper sensitive	Chr1: 13794686-13799906	<i>PHS1</i>	LOC_Os01g24470	UpStream	طول خوشه
	-	-	-	InFrame	
histone-like transcription factor and archaeal histone	Chr1: 13788467-13789890	-	LOC_Os01g24460	DownStream	
zinc finger C3HC4 type domain containing protein expressed	Chr6: 2335680-2336297	-	LOC_Os06g05200	UpStream	طول خوشه
	-	-	-	InFrame	
DNA-repair protein	Chr6: 2329883-2334474	<i>BRCA1</i>	LOC_Os06g05190	DownStream	
	Chr7: 1194383-1195595	-	LOC_Os07g03120	UpStream	RM6697*
	-	-	-	InFrame	

DownStream LOC_Os07g03110 *OsFBX213* Chr7: 1183280-1185666 F-box domain containing protein

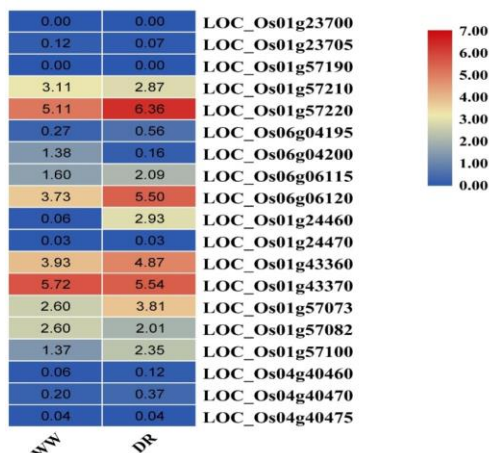
ادامه جدول ۵. اطلاعات ژن‌های شناسایی شده مرتبط با نشانگرهایی که در پژوهش حاضر با صفات زراعی و عملکرد دانه برنج در شرایط تنش خشکی ارتباط معنی‌دار نشان دادند.

شرح ژن	موقعیت	نام ژن	نام مکان	SSR-Linked	صفت
retrotransposon protein	Chr2: 2020969-2023488	-	LOC_Os02g04540	UpStream RM211	طول برگ پرچم
-	-	-	-	InFrame	-
rust resistance-like protein RP1	Chr2: 2011707-2018122	-	LOC_Os02g04530	DownStream M6697*	-
-	Chr7: 1194383-1195595	-	LOC_Os07g03120	UpStream	-
-	-	-	-	InFrame	-
F-box domain containing protein	Chr7: 1183280-1185666	<i>OsFBX213</i>	LOC_Os07g03110	DownStream RM302	-
kinase activity	Chr1: 32996762-32999264	-	LOC_Os01g57100	UpStream	-
insulin-degrading enzyme	Chr1: 32984982-32994519	-	LOC_Os01g57082	InFrame	-
insulin-degrading enzyme	Chr1: 32965305-32977407	-	LOC_Os01g57073	DownStream	-
transposon protein	Chr2: 2887328-2892037	-	LOC_Os02g05850	UpStream RM279	-
Vernalization-insensitive protein	Chr2: 2876553-2882177	<i>VIL2</i>	LOC_Os02g05840	InFrame	-
ribulose biphosphate carboxylase small chain	Chr2: 2874934-2876452	-	LOC_Os02g05830	DownStream	-
zinc finger family protein	Chr8: 27842259-27847633	-	LOC_Os08g44230	UpStream RM3496*	تعداد خوشه
-	-	-	-	InFrame	-
GLTP domain containing protein	Chr8: 27834547-27838106	-	LOC_Os08g44220	DownStream RM304	-
-	Chr10: 18656549-18657973	-	LOC_Os10g34940	UpStream	-
-	-	-	-	InFrame	-
secretory protein	Chr10: 18640397-18641937	-	LOC_Os10g34930	DownStream	-
retrotransposon protein	Chr2: 2020969-2023488	-	LOC_Os02g04540	UpStream RM211	تعداد دانه در خوشه
-	-	-	-	InFrame	-
rust resistance-like protein RP1	Chr2: 2011707-2018122	-	LOC_Os02g04530	DownStream RM6697*	-
-	Chr7: 1194383-1195595	-	LOC_Os07g03120	UpStream	-
-	-	-	-	InFrame	-

ادامه جدول ۵. اطلاعات ژن‌های شناسایی شده مرتبط با نشانگرهایی که در پژوهش حاضر با صفات زراعی و عملکرد دانه برنج در شرایط تنش خشکی ارتباط معنی‌دار نشان دادند.

شرح ژن	موقعیت	نام ژن	نام مکان	SSR-Linked	صفت
F-box domain containing protein	Chr7: 1183280-1185666	<i>OsFBX213</i>	LOC_Os07g03110	DownStream RM279	-
transposon protein	Chr2: 2887328-2892037	-	LOC_Os02g05850	UpStream	-
Vernalization-insensitive protein	Chr2: 2876553-2882177	<i>VIL2</i>	LOC_Os02g05840	InFrame	-
ribulose biphosphate carboxylase small chain	Chr2: 2874934-2876452	-	LOC_Os02g05830	DownStream	-
-	Chr1: 12163770-12164080	-	LOC_Os01g21680	UpStream RM10772	-
-	Chr1: 12157455-12161768	-	LOC_Os01g21670	InFrame	-
-	Chr1: 12154685-12156630	-	LOC_Os01g21660	DownStream	-
zinc finger C3HC4 type domain containing protein expressed	Chr6: 2335680-2336297	-	LOC_Os06g05200	UpStream RM19367	دمای برگ
-	-	-	-	InFrame	-
DNA-repair protein	Chr6: 2329883-2334474	<i>BRCA1</i>	LOC_Os06g05190	DownStream	-
conserved peptide uORF-containing transcript	Chr1: 24808514-24813403	<i>CPuORF17</i>	LOC_Os01g43370	UpStream RM488	-
-	-	-	-	InFrame	-
myosin-Ie	Chr1: 24792133-24794372	-	LOC_Os01g43360	DownStream	-
zinc finger family protein	Chr8: 27842259-27847633	-	LOC_Os08g44230	UpStream RM3496*	گلدهی
-	-	-	-	InFrame	-
GLTP domain containing protein	Chr8: 27834547-27838106	-	LOC_Os08g44220	DownStream	-
Propyzamide hyper sensitive	Chr1: 13794686-13799906	<i>PHS1</i>	LOC_Os01g24470	UpStream RM10843	عملکرد دانه
-	-	-	-	InFrame	-
histone-like transcription factor and archaeal histone	Chr1: 13788467-13789890	-	LOC_Os01g24460	DownStream	-
zinc finger C3HC4 type domain containing protein expressed	Chr6: 2335680-2336297	-	LOC_Os06g05200	UpStream RM19367	-
-	-	-	-	InFrame	-

بالایی را نشان می‌دهد. علاوه بر این بیان ژن‌ها با کد دسترسی LOC_Os01g24460 از ۰/۰۶ به ۲/۹۳، LOC_Os01g43360 از ۳/۹۳ به ۴/۸۷، LOC_Os01g57073 از ۲/۶ به ۳/۸۱ و LOC_Os01g57100 از ۱/۳۷ به ۲/۳۵ افزایش یافته است، درحالی‌که ژن با کد دسترسی LOC_Os01g57082 از ۲/۶۰ به ۲/۰۱ کاهش بیان نشان می‌دهد. ژن‌های متفاوت شناسایی شده و نیز الگوی بیانی آنها در شرایط بدون تنش و تنش خشکی می‌تواند نشان‌دهنده فرآیندهای متنوع گیاه در رشد و نمو و حفظ عملکرد در شرایط متفاوت زیستی نظیر تنش خشکی باشد.



شکل ۱. الگوی بیانی ژن‌های اختصاصی شناسایی شده برای شرایط بدون تنش و تنش خشکی در برنج. داده‌های بیانی به صورت $\log_2(\text{FPKM}+1)$ در شرایط آبیاری (WW) و تنش خشکی (DR) ارائه شده‌اند. میزان بیان از صفر تا ۷ بر اساس شاخص رنگی ارائه شده است.

از بین این ژن‌ها، ژن با کد دسترسی LOC_Os06g04200 در تنظیم بیوستنز نشاسته نقش دارد (Wambugu *et al.*, 2017). همچنین الگوی بیان ژن با کد دسترسی LOC_Os01g24460 بستگی به مرحله رشد و نمو در برنج دارد و چون در مراحل مختلف نمو بیان

از بین ژن‌های شناسایی شده به صورت بیوانفورماتیکی، در مجموع ۹ ژن، که ژن‌های با کد دسترسی LOC_Os01g23700، LOC_Os01g23705 مربوط به وزن خوشه و عملکرد دانه، LOC_Os01g57190، LOC_Os01g57210، LOC_Os01g57220، طول برگ پرچم، LOC_Os06g04195، LOC_Os06g04200، عملکرد دانه، LOC_Os06g06115 و LOC_Os06g06120 مربوط به گلدهی، اختصاصی شرایط بدون تنش می‌باشند. همچنین کد دسترسی ۱۰ ژن اختصاصی شرایط تنش خشکی که در کنترل صفات نقش دارند شامل LOC_Os01g24460

مربوط به وزن خوشه، LOC_Os01g24470، LOC_Os01g43360، LOC_Os01g43370، دمای برگ، LOC_Os01g57073، LOC_Os01g57082، طول برگ پرچم، LOC_Os04g40460، LOC_Os04g40475 و LOC_Os04g40470 مربوط به ارتفاع بوته می‌باشد.

مطابق شکل ۱ الگوی بیان ژن‌های مذکور در شرایط بدون تنش و تنش خشکی با استفاده از داده‌های RNA-seq نشان داد که از بین ژن‌های اختصاصی شرایط بدون تنش، بیان ژن با کد دسترسی LOC_Os01g57220 از ۵/۱۱ به ۶/۳۶، LOC_Os06g06115 از ۱/۶۰ به ۲/۰۹ و LOC_Os06g06120 از ۳/۷۳ به ۵/۵۰ طی تنش خشکی افزایش و بیان ژن‌ها با کد دسترسی LOC_Os06g04200 از ۱/۳۸ به ۰/۱۶ و LOC_Os01g57210 از ۳/۱۱ به ۲/۸۷ کاهش یافته است. همچنین در بین ژن‌های اختصاصی شرایط خشکی بیش‌ترین بیان ژن مربوط به ژن با کد دسترسی LOC_Os01g43370 (۵/۵۴) می‌باشد که بیان آن در شرایط کنترل و تیمار بیان

حاصل از تلاقی رقم شاه‌پسند و IR28، تعدادی از نشانگرها از جمله، نشانگر RM211 و RM6697 به طور مشترک با چندین صفت ارتباط معنی داری داشتند که با توجه به امکان بهبود چند صفت همزمان به کمک چنین نشانگرهایی می‌توان در برنامه‌های به-نژادی از آن‌ها بهره برد. همچنین نشانگرهایی شناسایی شدند که توانستند درصد قابل توجهی از تغییرات فنوتیپی صفات را توجیه کنند مثل نشانگرهای RM3496 و RM211 در هر دو شرایط و نشانگر RMES6-1 در شرایط تنش خشکی که نشان‌دهنده اهمیت این نشانگرها در این تحقیق می‌باشد. همچنین با توجه به نتایج روش‌های بیوانفورماتیکی مورد استفاده در این پژوهش، از بین ژن‌های شناسایی شده در دو شرایط بدون تنش و تنش خشکی، بیش‌ترین بیان ژن در شرایط بدون تنش مربوط به ژن با کد دسترسی LOC_Os01g57220 و نشانگر RM212 مربوط به صفت طول برگ پرچم و در شرایط تحت تنش خشکی مربوط به ژن با کد دسترسی LOC_Os01g43370 و نشانگر RM488 مربوط به صفت دمای برگ بود که بیان ژن‌های مذکور می‌تواند نشان‌دهنده حفظ عملکرد در شرایط تنش باشد.

REFERENCES

- Azizi H, Aalami A, Esfahani M, Ebadi AA (2017) Association and structure analysis of some of rice (*Oryza sativa* L.) genetic resources based on microsatellite markers. *Cereal Res.* 7(1): 1-16.
- Badirdast HB, SalehiLisar Y, Sabouri H, Movafeghi A, Gholamalipour Alamdari E (2018) Identification of informative Alleles controlling rice traits under flooding and drought stress conditions. *Plant Genet. Res.* 5(1): 39-54.
- Baisakh N, Yabes J, Gutierrez A, Mangu V, Ma P, Famoso A, Pereira A (2020) Genetic Mapping Identifies Consistent Quantitative Trait Loci for Yield Traits of Rice under Greenhouse Drought Conditions. *Genes*, 11(1): 62.
- BaniKamali M, Soltanloo H, Ramezanpour S, Yamchi A, Marde Momen F (2013) Isolation and characterization of genes cytochrome P450 and CaMBP response to salt stress in *Iavandula angustifolia* L. The First National Conference on Salinity Stress in Plant and developing strategies for saline agriculture. 12-13

ناقصی دارد در نتیجه نیاز به تبادل قطعه است که در این امر متیلاسیون دخیل می‌باشد (Zhang *et al.*, 2016). علاوه بر این Hayden و Jorgensen (۲۰۰۷) کارکرد مولکولی ژن با کد دسترسی LOC_Os01g43370 را، به صورت فاکتور رونویسی اعلام کردند. همچنین برای ژن دیگر، با کد دسترسی LOC_Os04g40470، پروتئینی از خانواده سیتوکروم P450 را کد می‌کند. سیتوکروم P450 به فرم‌های مختلفی در گیاه وجود دارد و از جمله وظایف آن کاتالیز مسیر اکسیداسیون ترکیبات آلی است. همچنین مسئول بیوستنز یا تجزیه طیف وسیعی از هورمون‌های گیاهی مانند ABA در زمان تنش است و علاوه بر این، با کاهش انواع اکسیژن فعال (ROS) و برقراری تعادل اسمزی، باعث ایجاد مکانیسم دفاعی گیاه در برابر تنش می‌شود (BaniKamali *et al.*, 2013).

نتیجه‌گیری کلی

به طور کلی آب یکی از چالش‌های بزرگ و محدود کننده در تولید برنج می‌باشد. با بهبود ارقام و شناسایی ژنوتیپ‌های متحمل به خشکی برنج، می‌توان از مناطق کم‌آب‌تر نیز برای کشت بهره برد. در بررسی حاضر با استفاده از ۴۰ رگه خویش آمیخته نوترکیب برنج (F9)

- Septamber.2013. Azarbaijan Shahid Madani University.623-629.
- Barker R, Dawe D, Tuong TP, Bhuiyan SI Guerra LC (1999) The outlook for water resources in the year 2020: challenges for research on water management in rice production. Southeast Asia, 1: 1-5.
- Bolser D, Staines DM, Pritchard E, Kersey P (2016) Ensembl plants: integrating tools for visualizing, mining, and analyzing plant genomics data. Plant bioinformatics. Humana Press, New York, NY. 115-140.
- Chen C, Chen H, He Y, Xia R (2018) TBtools, a toolkit for biologists integrating various biological data handling tools with a user-friendly interface. BioRxiv.1:289660.
- Ebadi AA (2013) Mapping QTLs related to cooking and eating quality in rice (*Oryza sativa* L.). Theses Phd, Razi University.
- Edwards JD, Baldo AM, Mueller LA (2016) Ricebase: a breeding and genetics platform for rice, integrating individual molecular markers, pedigrees and whole-genome-based data. Biological Databases and Curation. 2016.
- El Rabey H, Salem KH, Mattar M (2013) The genetic diversity and relatedness of eight rice (*Oryza sativa* L.) cultivars as revealed by AFLP and SSRs marker. Life Sci J. 10: 1471-1479.
- Essiet EU (2001) Agricultural sustainability under small-holder farming in Kano, northern Nigeria. J. Arid Environ. 48:1-7.
- FAO (2018) Food Agriculture Organization Statistic on line. <http://faostat.fao.org/site>
- Ghrekhani M, Navabpour S, Sabouri H, Ramezanpour S (2016) Study of genetic variation in iranin rice (*Oryza sativa* L.) using SSR markers. Crop Breed. 8(20): 107-115.
- Hayden C, Jorgensen R (2007) Identification of novel conserved peptide uORF homology groups in Arabidopsis and rice reveals ancient eukaryotic origin of select groups and preferential association with transcription factor-encoding genes. BMC Biol. 5(32).
- IBM Corp. (2016) IBM SPSS Statistics for Windows, Version 24.0. Armonk, NY IBM Corp. (Released 2016).
- Julio E, Denoyes-Rothan B, Verrier JL, Dorlhac De Borne F (2006) Detection of QTLs linked to leaf and smoke properties in *Nicotiana tabacum* based on a study of 114 recombinant inbred lines. J. Mol. Breed. 18: 69-91.
- Kamal AHM, Kim KH, Shin KH, Choi JS, Baik BK, Tsujimoto H, Heo HY, Park CS, Woo SH (2010) Abiotic stress responsive proteins of wheat grain determined using proteomics technique. Crop Sci. 4:196-208.
- Kawahara Y, Bastide M, Hamilton JP, Kanamori H, McCombie W R, Ouyang Sh, Schwartz DC, Tanaka T, Wu J, Zhou Sh, Childs KL, Davidson RM, Lin H, Quesada-Ocampo L, Vaillancourt B, Sakai H, Lee SSh, Kim J, Numa H, Itoh T, Buell CR, Matsumoto T (2013) Improvement of the (*Oryza sativa* L.) Nipponbare reference genome using next generation sequence and optical map data. Rice. 6(1): 4.
- McCouch, SR Doerge RW (1995) QTL mapping in rice. Trends Genet. 11: 482-487.
- Muthu V, Abbai R, Nallathambi J, Rahman H, Ramasamy S, Kambale R, Thulasinathan T, Ayyenar B, Muthurajan, R. (2020) Pyramiding QTLs controlling tolerance against drought, salinity, and submergence in rice through marker assisted breeding. PLoS ONE 15(1): e0227421.
- MonacoMK, Stein J, Naithani S, Wei Sh, Dharmawardhana P, Kumari S, Amarasinghe V, Youens-Clark K, Thomason J, Preece J, Pasternak Sh, Olson A, Jiao Y, Lu Zh, Bolser D, Kerhornou A, Staines D, Walts B, Wu

- G, Eustachio PD, Haw R, Croft D, Kersey PJ, Stein L, Jaiswal P, Ware D (2013) Comparative plant genomics resources. *Nucleic Acids Res.* 42:1193-1199.
- Navabpour S, Haddad R (2011) Evaluation of glutamine syntetase gene role in growth stage of brassica napusat and drought stress condition. *Crop Breed.* 6(2): 26-36.
- Nei YY, Zhang L, Wu YH, Liu HJ, Mao WW, Du J, Xiu HL, Wu XY, Li X, Yan YW, Liu GL, Liu HY, Hu SP (2015) Screening of candidate genes and fine mapping of drought tolerance quantitative trait loci on chromosome 4 in rice (*Oryza sativa* L.) under drought stress. *Ecol. Evol.* 5(21): 5007-5015.
- Ngangkham U, De SK, Parida S, Kumar KAR, Singh AK, Singh KN, Mahapatra T (2010) Genic markers for wild abortive (WA) cytoplasm based male sterility and its fertility restoration in rice. *Mol. Breed.* 26: 275-292.
- Oliveira Borba TC, Brondani RPV, Breseghello F, Coelho ASG, Mendonca JA, Rangel PHN, Brondani C (2010). Association mapping for yield and grain quality traits in rice (*Oryza sativa* L.). *Genet. Mol. Biol.* 33(3): 515-524.
- Sabouri H, Rezai A, Moumeni A, Kavousi M (2007) Investigation of genetic diversity of Iranian rice genotypes under salinity condition: compare means, sensitive and tolerance index. In: Bocchi, S., Ferrero, A., Porro, A. (ed.): *Proceedings of the 4th International Temperate Rice Conference*, TipografiaFiordo, Novara. 50-51.
- Sabouri H, Hosseini M (2018) *Rice: Botany, Yield Physiology, Agronomy and Breeding*. GonbadKavous University Press.
- Sabouri A, Dadras AR, Khoshchereh H, Vatanparast A, H. Afltooni H (2019). Investigation of rice recombinant inbred lines based on drought tolerance using tolerance indices and SSR marker. *Iranian Journal of Field Crop Sci.* 49(4): 13-24.
- SaghaiMaroof MA, Biyashev RM, yang GP, Zhang A, Allard.W (1994) Extra ordinarily polymorphism microsatellite DNA in Barley: Species Diversity, Chromosomal Locations, and Population Dynamics. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 91: 5466-547.
- Samizadeh-Lahiji HA, Edrisi-Maryan Kh (2013) *Abiotic Stress Tolerance in Plants: Toward the Improvement of Global Environment and Food* (translated). Guilan University Press.
- Senadhira D (1987) Salinity as a constraint to increasing rice production in Asia. *Required Workshop on Maintenance of Life Support Species in Asia Pacific Region.* 4-7.
- Tabkhkar N, Rabiei B, Samizadeh-Lahiji H, Hosseini Chaleshtori M (2018) Genetic variation and association analysis of the SSR marker linked to the major drought yield QTLs of rice. *Biochem Genet.* 56(4):356-374.
- Tuberosa R, Gill BS, Quarrie SA (2002) Cereal genomics: ushering in a brave new world. *Plant Mol. Biol.* 48(5): 445-449.
- Tuyen DD, Prasad DT (2008) Evaluation different of yield trait among rice genotype (*Oryza sativa* L.) under low moisture condition using candidate gene markers. *Omonrice.* 16: 24-33.
- Venuprasad R, Bool ME, Quiatchon L, Atlin GN (2012) A QTL for rice grain yield in aerobic environment with large effect in three genetic background. *Theor. Appl. Genet.* 124: 323-332.
- Vikram P, Kumar A, Singh A, Singh NK (2012) *Rice: Genomics-Assisted Breeding for Drought Tolerance*. Tuteja N, Singh Gill S, Tiburcio AF, Tuteja R. pp.731.

- Wambugu P, Ndjioudjop MN, Furtado A, Henry R (2017) Sequencing of bulks of segregants allow dissection of genetic control of amylase content in rice. *Biotechnology*. 16(1): 100-110.
- Xia L, Zou D, Sang J, Xu X, Yin H, Li M, Wu S, Hu S, Hao L, Zhang Z (2017) Rice Expression Database (RED): An integrated RNA-Seq-derived gene expression database for rice. *J. Genet. Genomics*. 44(5):235-41.
- Yadaw RB, DixitSh, Raman A, Kumar Mishra K, Vikram P, Swamy BPM, Sta Cruz MT, Maturan PT, Kumar A (2013) A QTL for high grain yield under lowland drought in the background of popular rice variety Sabitri from Nepal. *Field Crops Res*. 144:281-287.
- Zhang H, Liu Y, Han M, Wu L, Liu Zh, Chen X, Xu P, Wu X (2016) The effects of DNA methylation on the expression of non-imprinted genes in rice. *J Rice Res*, 4(168), 2.