

تفکیک و شناسایی تعدادی از لاین‌ها و هیبریدهای برنج (*Oryza sativa* L.) با استفاده از نشانگرهای مولکولی مرتبط با تحمل به سرما

فاطمه چمنی محمص^۱، حبیب‌اله سمیع‌زاده لاهیجی^{۲*}، محمد مهدی سوهانی^۳، بابک ربیعی^۲
و سهیلا طالش ساسانی^۴

۱، ۲ و ۳- به ترتیب دانشجوی سابق کارشناسی ارشد، دانشجویان و استادیار گروه زراعت و اصلاح نباتات دانشکده علوم کشاورزی دانشگاه گیلان، ۴- مربی گروه علوم باغبانی دانشکده علوم کشاورزی دانشگاه گیلان

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۵/۲۴ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۱۱/۱۶)

چکیده

به منظور تعیین قرابت ژنتیکی چهار لاین ایرانی حساس به سرما و پنج لاین مقاوم به سرما با منشأ IRRI و ۲۰ هیبرید حاصل از تلاقی آن‌ها، تعداد ۲۴ نشانگر SSR مرتبط با QTLهای کنترل‌کننده مقاومت به سرما و چهار نشانگر مرتبط با ژن‌های مقاومت به سرما مورد ارزیابی قرار گرفتند. بررسی ارتباط بین نشانگرهای SSR مرتبط با QTLهای کنترل‌کننده مقاومت به سرما با ارقام حساس و مقاوم به سرما نشان داد که نشانگرهای RM263، RM270، RM261، RM292، RM283، RM7200، RM7003، RM239، RM6770، RM101 و RM335 به خوبی توانستند ژنوتیپ‌های حساس ایرانی را از ژنوتیپ‌های مقاوم به سرما با منشأ IRRI جدا کنند. ژنوتیپ‌های حسنی و بینام به ترتیب بیش‌ترین و کم‌ترین شباهت را با ژنوتیپ‌های با منشأ IRRI داشتند. نشانگرهای مرتبط با ژن‌های مقاوم به سرما در بین والدین چند شکلی نشان ندادند. از میان ۲۴ نشانگر SSR استفاده شده، ۱۸ نشانگر چند شکلی نشان دادند که تعداد ۵۱ نوار چند شکلی را بین ۹ ژنوتیپ والدی تولید کردند. از بین نشانگرهای SSR، RM84 و RM202 با شش و پنج نوار بیش‌ترین و نشانگرهای RM335، RM292، RM420، RM341، RM261، RM270 و RM283 با دو نوار کم‌ترین تعداد نوار چند شکلی را ایجاد نمودند. محتوای اطلاعات چند شکلی (PIC) نشانگرهای SSR بین ۰/۲۵ تا ۰/۴۰ متغیر بود. تجزیه خوشه‌ای به روش UPGMA بر اساس ضریب تطابق ساده و بر پایه نشانگرهای SSR، نه لاین والدینی و ۲۰ هیبرید آنها را در چهار گروه قرار داد، که به ترتیب شامل ۵، ۶، ۱۵ و ۳ ژنوتیپ بودند. در مجموع هیبریدها شباهت بیش‌تری با ژنوتیپ‌های IRRI داشتند. تابع تشخیص کانونی به روش خطی فیشر نشان داد که صحت گروه بندی حاصل از تجزیه خوشه‌ای ۹۳/۱ درصد بود.

واژه‌های کلیدی: تابع تشخیص، تجزیه خوشه‌ای، ضریب تطابق ساده، مقاومت به سرما، نشانگرهای SSR.

مقدمه

برنج (*Oryza sativa* L.) دومین غله مهم دنیا است و از لحاظ تولید دانه بعد از گندم رتبه دوم را به خود اختصاص داده است. تقریباً تمامی برنج تولید شده به مصرف غذایی انسان می‌رسد و غذای اصلی بیش از یک سوم مردم جهان محسوب می‌شود. برنج محصول فصل گرم بوده و عمدتاً در مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری دنیا کشت می‌شود (Arzani, 2004). درجه حرارت بهینه برای جوانه زنی دانه و رشد اولیه جوانه برنج از ۲۵ تا ۳۵ درجه سانتی‌گراد است. اولین مرحله جوانه زنی در این گیاه برای ایستادگی ثابت گیاهچه و رشد و نمو بعدی مهم است و درجه حرارت زیر ۱۵ درجه سانتی‌گراد در این مرحله معمولاً استقرار ضعیف گیاهچه و افزایش مرگ آن را منجر می‌شود (Jiang et al., 2007).

بررسی آمار چهل ساله هواشناسی شمال کشور نشان می‌دهد که شالیزارهای این ناحیه همواره در خطر بروز تنش سرما بوده و حتی در پاره‌ای سال‌ها دمای هوا به پایین‌تر از نقطه بحرانی تحمل برنج می‌رسد. تنش سرما همواره یکی از عوامل محدود کننده رشد گیاه برنج در شالیزارهای کشور بوده و سالانه موجب بروز خسارت به زراعت برنج خصوصاً در خزانه و مراحل ابتدای رشد می‌شود (Hassibi et al., 2007). از این رو، افزایش سطح مقاومت به سرما در برنامه‌های اصلاحی برنج مورد توجه قرار گرفته است.

یکی از کاربردهای مهم نشانگرها در اصلاح نباتات انتخاب به کمک نشانگر (MAS) می‌باشد. هدف این است که بتوان صفت مورد نظر را با واسطه نشانگر پیوسته با صفت، انتخاب کرد. این مسئله بسیار مهم است چرا که اگر پیوستگی یک نشانگر با ژن مورد نظر تایید شود آنگاه می‌توان در هر مرحله‌ای از رشد گیاه و در هر محیطی اقدام به گزینش نمود. اغلب صفات مهم زراعی مثل عملکرد، مقابله با خشکی، شوری و سرما صفاتی کمی هستند که توسط مکان‌های کنترل کننده صفات کمی (QTL) کنترل می‌شوند؛ لذا امروزه در پروژه‌های اصلاحی، سعی بر نقشه یابی QTLها است تا بتوان از آن‌ها در انتخاب به کمک نشانگر استفاده کرد (Naghavi et al., 2009). همچنین تجزیه به مختصات اصلی در بیان تنوع

ژنتیکی بر اساس صفات کیفی کاربرد زیادی دارد و با استفاده از آن می‌توان الگوهای تنوع را به صورت چند بعدی نشان داد و اجازه تفسیر بیشتری در مورد ارتباط بین افراد را فراهم کرد (Khayam Nekouei et al., 2009).

تحمل به سرما در هر دو مرحله رویشی و زایشی یک هدف اصلاحی مهم برای تهیه رقم‌های برنج در مناطق معتدل و مرتفع گرمسیری و نیمه گرمسیری است. QTLهای بزرگ اثر در مقاومت به سرما در مراحل رویشی و زایشی در MAS جهت اصلاح مقاومت به سرما استفاده می‌شوند (Jena and Mackill, 2008).

هدف این تحقیق بررسی تعدادی از لاین‌های حساس و مقاوم به سرمای برنج و هیبریدهای حاصله از آن‌ها (معرفی شده از طرف مؤسسه تحقیقات برنج کشور) با استفاده از نشانگرهای SSR مرتبط با QTLهای کنترل کننده مقاومت به سرما و نشانگرهای مرتبط با ژن‌های مقاومت به سرما و بررسی کارایی آن‌ها در انتخاب است.

مواد و روش‌ها

در این بررسی ۴ ژنوتیپ بومی ایرانی حساس به سرما به عنوان لاین و ۵ ژنوتیپ مقاوم به سرمای IRRI به عنوان تستر به همراه ۲۰ هیبرید حاصل از دورگ‌گیری آن‌ها، که بر اساس روش لاین × تستر توسط قربانی و همکاران (Ghorbani et al., 2009) تهیه شده بودند، از دیدگاه ژنتیکی بررسی شدند (جدول ۱). مقاومت و حساسیت لاین‌ها و هیبریدها در مقابل سرما توسط اله قلی پور و همکاران (Allah gholipur et al., 2011) در مؤسسه تحقیقات برنج کشور بررسی شد. بذر لاین‌ها و هیبریدها از مؤسسه تحقیقات برنج کشور تهیه و در خزانه مؤسسه تحقیقات برنج کاشته شد. استخراج DNA با استفاده از CTAB به روش سقایی معروف و همکاران (Saghai Maroof et al., 1994) با اندکی تغییر انجام شد و از اسپکتروفوتومتری برای کمیت سنجی استفاده شد. در این تحقیق از چهار نشانگر مرتبط با ژن‌های مقاوم به سرما (جدول ۲) و ۲۴ نشانگر SSR مرتبط با QTLهای کنترل کننده مقاومت به سرما (جدول ۳) استفاده شد. واکنش PCR در حجم ۱۰ میکرولیتر و با

جدول ۱- اسامی لاین‌ها و هیبریدهای برنج

Table 1. The names of rice lines and hybrids

ردیف No.	لاین Line	ردیف No.	هیبرید Hybrid	ردیف No.	هیبرید Hybrid
1	Hassani (حسنی)	10	Hassani/ IR72944-1-2-2	20	Domsiah/ IR73694-41-2
2	Binam (بینام)	11	Binam/ IR72944-1-2-2	21	Hashemi/ IR73694-41-2
3	Domsiah (دم‌سیاه)	12	Domsiah/ IR72944-1-2-2	22	Hassani/ IR76687-22-1-3-2-5
4	Hashemi (هاشمی)	13	Hashemi/ IR72944-1-2-2	23	Binam/IR76687-22-1-3-2-5
5	IR72944-1-2-2	14	Hassani/IR73688-57-2	24	Domsiah/ IR76687-22-1-3-2-5
6	IR73688-57-2	15	Binam/ IR73688-57-2	25	Hashemi/ IR76687-22-1-3-2-5
7	IR73694-41-2	16	Domsiah/ IR73688-57-2	26	Hassani/PR27137-30R153
8	IR76687-22-1-3-2-5	17	Hashemi/ IR73688-57-2	27	Binam/ PR27137-30R153
9	PR27137-30R153	18	Hassani/IR73694-41-2	28	Domsiah/ PR27137-30R153
		19	Binam/ IR73694-41-2	29	Hashemi/ PR27137-30R153

جدول ۲- آغازگرهای میتنی بر ژن‌های مقاومت به سرما

Table 2. The primers associated with cold tolerant genes

ژن Gene	توالی بازها در آغازگر رو به جلو و رو به عقب (5'-3') The sequences of the forward and reverse primer (5'-3')	منبع Reference
<i>OsCIPK03</i>	5'-CAG GCA CTG AAT CTG GAC AA-3' 5'-GCT ACT CTA CGG CGA ACA CC-3'	Xiang <i>et al.</i> , (2007)
<i>OsDREB1A</i>	5'-GCT CCG ATT ACG AGT CTT C-3' 5'-TTC TCC GAC GAA CTC CTC-3'	Neha Garg <i>et al.</i> ,(2008)
<i>OsP5CS2</i>	5'- TTTACGAATTGATCCTGCG-3' 5'- TTAAGGTCAT GCGAGGAGAG -3'	Hur <i>et al.</i> , (2004)
<i>OsLTi6a</i>	5'-AAT ACT GCG AGA GAA ATT AAT CA-3' 5'-TAA GAG GGG AGC TTA TTC ACA C-3'	Morsy and Stewart, (2006)

آغازگر یعنی 55°C رسید و در سایر چرخه‌ها در همین دما ثابت ماند. دمای بسط آغازگر نیز در تمام چرخه‌ها 72°C برای ۱ دقیقه در نظر گرفته شد. در نهایت یک چرخه اضافی با دمای 72°C برای ۵ دقیقه جهت اطمینان از سنتز تمام آغازگرهای متصل شده نیز انجام شد. فرآورده‌های تکثیر با آغازگرهای SSR ابتدا با استفاده از ژل آگارز ۳٪ جداسازی شدند و از اتیدیوم بروماید برای ظاهر ساختن نوارها استفاده شد (شکل ۱). نشانگرهایی که روی ژل آگارز ۳٪ چندشکلی نشان ندادند، با استفاده از ژل اکریل آمید ۶٪ جداسازی شده و از نیترات نقره برای ظاهر سازی استفاده شد. الگوی نواری بر اساس وجود (یک) یا عدم وجود (صفر) نوارها نمره‌دهی شدند.

استفاده از دستگاه ترموسایکلر BioRad انجام شد. برای تهیه مخلوط واکنش در حجم نهایی ۱۰ میکرولیتر برای هر نمونه، ۱ میکرولیتر بافر PCR (۱۰ برابر)، ۰/۴۸ میکرولیتر MgCl_2 (۵۰ میلی مولار)، ۰/۶ میکرولیتر مخلوط چهار نوع dNTPs (۲ میلی مولار)، ۰/۴ میکرولیتر از هر آغازگر مستقیم و معکوس (۶۰ نانوگرم در میکرولیتر)، ۵ واحد آنزیم تک دی. ان. ای پلی‌مراز (۰/۱۲ میکرولیتر)، ۲ میکرولیتر DNA ژنومی با غلظت ۱۰ نانوگرم در میکرولیتر و ۵ میکرولیتر آب دو بار تقطیر استریل با هم مخلوط شدند. دمای اتصال آغازگر به صورت Touch down در چرخه اول از 65°C برای یک دقیقه آغاز شد به نحوی که در هر چرخه این دما به اندازه 1°C کاهش یافت تا در سیکل دهم به دمای اتصال واقعی

جدول ۳- نشانگرهای SSR مرتبط با تحمل به سرما
Table 3. The SSR markers associated with cold tolerance

نشانگر Marker	کروموزوم Chromosome	اندازه (جفت باز) Size (bp)	توالی بازها در آغازگر رو به جلو و رو به عقب (5'-3') The sequences of the forward and reverse primer (5'-3')	منبع Reference
RM263	2	199	CCC AGG CTA GCT CAT GAA CC GCT ACG TTT GAG CTA CCA CG	Longzhi <i>et al.</i> , 2007
RM202	11	189	GCCTCGAGCATCATCATCAG ATCAACCTGCACTTGCCTGG	Zhang <i>et al.</i> , 2004
RM230	8	257	GCC AGA CCG TGG ATG TTC ACA TAT GGG ACC CAC CTG TC	Lu <i>et al.</i> , 1997
RM239	10	144	TAC AAA ATG CTG GGT ACC CC ACA TAT GGG ACC CAC CTG TC	Andaya <i>et al.</i> , 2003
RM 19	12	226	CAA AAA CAG AGC AGA TGA C CTC AAG ATG GAC GCC AAG A	Roawake <i>et al.</i> , 2008
RM9	1	136	GGT GCC ATT GTC GTC CTC ACG GCC CTC ATC ACC TTC	Longzhi <i>et al.</i> , 2007
RM31	5	140	GAT CAC GAT CCA CTG GAG CT AAG TCC ATT ACT CTC CTCCC	Shen <i>et al.</i> , 2005
RM204	6	169	ACCCAACACTACGATCAGCTCG CTCCAGGAACACGCTCTTTC	Liu <i>et al.</i> , 2003
RM420	7	197	GGACAGAATGTGAAGACAGTCG ACTAATCCACCAACGCATCC	Lou <i>et al.</i> , 2007
RM283	1	151	GTCTACATGTACCCTTGTTGGG CGGCATGAGAGTCTGTGATG	Temnykh <i>et al.</i> , 2000
RM262	2	154	CATTCCGTCTCGGCTCAACT CAGAGCAAGGTGGCTTGC	Longzhi <i>et al.</i> , 2007
RM26	6	112	TGGTCAAACCAAGGTCCTTC GACATACATTCTACCCCCGG	Andaya <i>et al.</i> , 2003
RM84	1	113	GCCACCAGTAAAAGCAATAC TTGATCTGCTAGTGAGACCC	Lou <i>et al.</i> , 2007
RM270	12	108	CACTCACACGAACGACTGAC CGCAGGTTCTTGTGAAATGT	Longzhi <i>et al.</i> , 2007
RM6770	4	158	ACCAATTCCACCTTCACTCG GGAGGAAGAGTTGTTGCTGC	Andaya <i>et al.</i> , 2007
RM101	12	324	GTGAATGGTCAAGTGACTTAGGTGGC ACACAACATGTTCCCTCCCATGC	Andaya <i>et al.</i> , 2003
RM7200	4	174	TCGATGGTGACGATGATACG ACACAACAAAGGGATGGTCC	Andaya <i>et al.</i> , 2007
RM335	4	104	GTACACACCCACATCGAGAAG GCTCTATGCGAGTATCCATGG	Andaya <i>et al.</i> , 2003
RM341	2	172	CAAGAAACCTCAATCCGAGC CTCCTCCCGATCCCAATC	Lou <i>et al.</i> , 2007
RM561	2	190	GAGCTGTTTTGGACTACGGC GAGTAGCTTCTCCACCCC	Lou <i>et al.</i> , 2007
RM 292	12	159	ACTGCTGTTGCGAAACGC TGCAGCAAATCAAGCTGGAA	Andaya <i>et al.</i> , 2003

ادامه جدول ۳

Table 3. continued

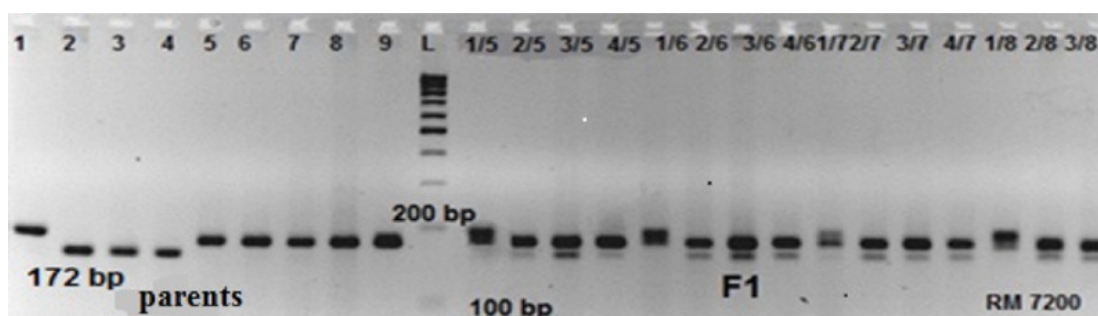
نشانگر Marker	کروموزوم Chromosome	اندازه (جفت باز) Size (bp)	توالی بازها در آغازگر رو به جلو و رو به عقب (5'-3') The sequences of the forward and reverse primer (5'-3')	منبع Reference
RM7003	12	101	GGCAGACATACAGCTTATAGGC TGCAAATGAACCCCTCTAGC	Andaya et al., 2006
RM 261	4	125	CTACTTCTCCCCTTGTGTCTG TGTACCATCGCCAAATCTCC	Andaya et al., 2003
RM81	1	110	GAGTGCTTGTGCAAGATCCA CTTCTTCACTCATGCAGTTC	Liu et al., 2003

RM292, RM341, RM420, RM270, RM261 و RM283 با تعداد ۲ باند، کمترین تعداد را داشتند. اکثریت نشانگرها چند شکل بودند. بنابراین، توانستند به خوبی تنوع ژنتیکی بین ژنوتیپها را نشان دهند و قادر به تفکیک ژنوتیپها از هم بودند. نشانگرهای RM84, RM202 و RM6770 با بیشترین تعداد باند، توانستند تنوع ژنتیکی بین ژنوتیپهای برنج را بهتر نشان دهند. به طور کلی اعتبار نشانگرها باید به وسیله آزمون اثر بخشی‌شان در تشخیص فنوتیپ مورد نظر در جمعیت‌های مستقل و زمینه‌های ژنتیکی متفاوت بررسی تا به عنوان نشانگر معتبر نامیده شوند (Cakir et al., 2003). در این پژوهش از چهار ژنوتیپ حساس به سرما ایرانی و پنج ژنوتیپ متحمل به سرمای IRRI به همراه ۱۸ نشانگر SSR مرتبط با سرما استفاده شد. از بین نشانگرهای استفاده شده، RM292, RM261, RM270, RM263 و RM283 با داشتن دو باند یک باند مربوط به ژنوتیپهای IRRI (متحمل به سرما) و یک باند مربوط به ژنوتیپهای ایرانی (حساس به سرما)، به راحتی، آن‌ها را جدا کردند. با توجه به اینکه ممکن است کار با این نشانگرها برای به‌نژادگر راحت‌تر باشد و در صورت اینکه این نشانگرها با تعداد ژنوتیپ بیشتری آزمایش شوند، می‌توانند در MAS مورد استفاده قرار گیرند. نشانگرهای RM7200, RM7003, RM239, RM6770, RM101 و RM335 نیز به‌خوبی ژنوتیپهای IRRI (متحمل به سرما) و ژنوتیپهای ایرانی (حساس به سرما) را از هم جدا کردند

داده‌های حاصل به صورت یک ماتریس ۲۹×۵۱ وارد نرم افزار Excel شد که در آن ۲۹ ژنوتیپ برنج تعداد ۵۱ نوار تشکیل دادند. برای ارزیابی تنوع ژنتیکی از مؤلفه میزان اطلاعات چندشکل (Polymorphism Information Content) با استفاده از رابطه $PIC = 1 - \sum p_i^2$ استفاده شد که در آن، p_i فراوانی آلل i ام و n تعداد آلل است. گروه‌بندی ژنوتیپها بر اساس رتبه‌دهی صفر و یک انجام شد. تشابه ژنتیکی بین ژنوتیپها با روش تطابق ساده (Sokal and Michener, 1958) محاسبه شد و برای گروه‌بندی ژنوتیپها از تجزیه خوشه‌ای به روش UPGMA و نرم افزار NTSYS نسخه ۲ (Rohlf, 1998) استفاده شد. جهت تجزیه به بردار اصلی از نرم افزار GenStat نسخه ۱۲ (VSN International, 2009) و جهت تجزیه تابع تشخیص از نرم افزار SPSS16.0 استفاده شد.

نتایج و بحث

در این پژوهش از ۲۴ نشانگر SSR استفاده شد، که از بین آن‌ها ۱۸ نشانگر در بین والدین چندشکلی نشان دادند. از مجموع ۱۸ نشانگر چندشکل استفاده شده در بین ۹ والد، ۵۳ باند تشکیل شد که از بین آن‌ها ۵۱ باند (۹۶/۳ درصد) چندشکل بودند. میانگین تعداد باندهای چندشکل به ازای هر نشانگر معادل ۲/۸ باند بود. از بین نشانگرهای مورد استفاده، نشانگر RM84 با تعداد ۶ باند و بعد از آن، نشانگرهای RM202, RM6770 به ترتیب با تعداد ۵ باند و ۴ باند، بیشترین تعداد باند و نشانگرهای



شکل ۱- الگوی بانندی حاصل از تکثیر ۲۹ ژنوتیپ برنج مورد مطالعه با استفاده از نشانگر RM7200 (شماره گذاری براساس جدول ۱).
Figure 1. The banding patterns resulted from the amplification of 29 studied rice genotypes using RM7200 marker (The numbering is according to Table 1).

(شکل ۱). هم‌چنین نشانگرهای ذکر شده نشان دادند که ژنوتیپ حسنی شبیه به ژنوتیپ‌های IRRI است. می‌توان این فرض را کرد که ژنوتیپ حسنی مقاومت به سرمای بیش‌تری نسبت به بقیه ژنوتیپ‌های ایرانی دارد. بقیه نشانگرها به خوبی نتوانستند ژنوتیپ‌های IRRI (متحمل به سرما) و ژنوتیپ‌های ایرانی (حساس به سرما) را جداسازی کنند.

محتوای اطلاعات چندشکل (PIC) در این تحقیق برای نشانگرهای SSR در بین والدین از ۰/۲۷ تا ۰/۴۹ و میانگین محتوای اطلاعات چندشکل ۰/۳۸ بود (جدول ۴). بالاترین میزان PIC در نشانگرهای RM292، RM261، RM270 و RM283 به میزان ۰/۴۹ تعیین شد که نشان‌دهنده کارایی بالای این نشانگرها در تمایز ژنوتیپ‌های والدینی مورد استفاده در این تحقیق بود. همچنین این نشانگرها با داشتن دو باند یک باند مربوط به ژنوتیپ‌های IRRI (متحمل به سرما) و یک باند مربوط به ژنوتیپ‌های ایرانی (حساس به سرما)، به راحتی، آن‌ها را جدا کرده بودند. ژانگ و همکاران (Zhang *et al.*, 2010) در بررسی فاصله ژنتیکی ۱۸ لاین نر عقیم و ۱۱ لاین برگرداننده باروری در برنج با استفاده از ۴۱ نشانگر SSR مرتبط با عملکرد، ۴۱ مکان را با چند شکلی تقریباً ۱۰۰ درصد با ۱۰۵ باند گزارش نمودند. تعداد باند در هر نشانگر از دو تا چهار باند با میانگین ۲/۵۶ باند بود. نتایج این پژوهش از نظر تعداد باند و درصد باندهای چند شکل تقریباً مشابه با مطالعه‌ی این محققین بود.

آغازگرهای چهار ژن سرمای مورد استفاده در بین والدین، باندهای چند شکل نشان ندادند. دلیل آن می‌تواند این باشد که ژنوتیپ‌های برنج مورد مطالعه از نظر این نشانگرها در سطح DNA تفاوتی ندارند و تفاوت آن‌ها از نظر این ژن‌ها ممکن است در سطح بیان آن‌ها باشد که توسط ادیسی و همکاران (Edrisi *et al.*, 2011) نیز نشان داده شده است. ادیسی و همکاران (Edrisi *et al.*, 2011) با بررسی میزان بیان ژن‌های اختصاصی و القاء شونده با سرما در سطح DNA و RNA، حضور این ژن‌ها را در برنج تأیید کردند. آن‌ها هم‌چنین نشان دادند که این ژن‌ها در ژنوتیپ‌های مختلف و تیمار سرمایی، دارای سطح بیان متفاوتی هستند. میزان بیان ژن *OsLti6a* در ژنوتیپ PR (متحمل به سرما)، بعد از تنش سرمایی (۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت) افزایش پیدا کرد، در حالی که در ژنوتیپ هاشمی برنج (حساس به سرما) بعد از تنش سرمایی به طور چشم‌گیری کاهش پیدا کرد. میزان بیان ژن *OsP5CS2* در ژنوتیپ PR برنج قبل از تیمار سرمایی (۲۵ درجه سانتی‌گراد) کمتر از بیان این ژن در ژنوتیپ هاشمی بود. بعد از تیمار سرمایی، میزان بیان این ژن در PR افزایش پیدا کرد، در حالی که در ژنوتیپ هاشمی کاهش پیدا نمود. بیان ژن *OsCIPK03* در ژنوتیپ PR و هاشمی بعد از تیمار سرمایی کاهش پیدا کرد، با این تفاوت که میزان کاهش آن در PR کمتر از هاشمی بود. بیان ژن *OsDREB1* نیز در ژنوتیپ PR بعد از تنش سرمایی افزایش پیدا کرد، در مقابل در ژنوتیپ هاشمی، بیان این ژن کاهش پیدا کرد.

جدول ۴- تعداد آلل و محتوای اطلاعات چند شکل (PIC) حاصل از

۱۸ نشانگر SSR در ژنوتیپ‌های والدینی برنج مورد مطالعه

Table 4. The Number of alleles and polymorphic information content (PIC) resulted from 18 SSR markers on the rice parental genotypes

نشانگر marker	تعداد آلل Allele number	PIC
RM101	3	0.34
RM335	2	0.25
RM7200	3	0.30
RM7003	3	0.34
RM341	2	0.30
RM292	2	0.26
RM561	3	0.33
RM6770	4	0.44
RM261	2	0.26
RM26	3	0.34
RM420	2	0.30
RM202	5	0.37
RM270	2	0.26
RM31	3	0.33
RM239	3	0.34
RM84	6	0.37
RM283	2	0.26
RM263	3	0.40

داشتند. (۰/۹۶). همچنین سه هیبرید حاصل از تلاقی دم سیاه، هاشمی و حسنی نیز با این سه ژنوتیپ با هم شباهت زیادی داشتند (۰/۹۶). کم‌ترین شباهت بین بینام و 5-2-1-3-22-IR76687 (۰/۳۳) و دم سیاه و هاشمی با 5-2-1-3-22-IR76687 (۰/۳۷) بود. شباهت بین چهار ژنوتیپ دیگر IRR1 با بینام هم (۰/۳۷) بود. هم‌چنین شباهت کمی (۰/۳۷) بین بینام با هیبریدهای حاصل از تلاقی ژنوتیپ حسنی با ژنوتیپ‌های IRR1 بود.

ژانگ و همکاران (Zhang *et al.*, 2010) فاصله ژنتیکی بین ۱۸ لاین نر عقیم و ۱۱ لاین بازگرداننده باروری را با استفاده از ۴۱ نشانگر SSR مرتبط با عملکرد از ۰/۴۹ تا ۰/۸۷ با میانگین ۰/۷ گزارش کردند. وجود فاصله ژنتیکی نسبتاً بزرگ بین لاین‌های نر عقیم و برگرداننده باروری مشخص کرد که والدینی که استفاده شدند، به‌طور ژنتیکی و بالایی متفاوت و برای ایجاد یک ترکیب هتروزیس قوی، مناسب بودند.

گروه بندی والدین و F1 برپایه نشانگرهای SSR بر اساس روش UPGMA و برش نمودار از ناحیه ۰/۷۱، نه والد و بیست F1 مورد مطالعه را در چهار گروه قرار داد

گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها بر اساس رتبه‌دهی صفر و یک انجام شد. برای برآورد تشابه ژنتیکی بین ژنوتیپ‌ها از ضرایب مختلف استفاده شد و در نهایت از آن جایی که دندروگرام حاصل از روش UPGMA با ضریب تطابق ساده بالاترین ضریب همبستگی کوفنتیک را داشت این دندروگرام برای تفسیر انتخاب شد. ضریب همبستگی کوفنتیک بین ماتریس تشابه حاصل از ضریب تطابق ساده با ماتریس خروجی حاصل از دندروگرام تجزیه خوشه‌ای ۸۳ درصد بود و نشان داد که روش تجزیه خوشه‌ای مورد استفاده به خوبی توانسته است اطلاعات حاصل از نشانگرها را برای تفکیک ژنوتیپ‌های برنج مورد استفاده قرار دهد. براساس نشانگرهای SSR، میزان تشابه بین والدین و F1ها براساس ضریب تطابق ساده از ۹۹ درصد تا ۳۳ درصد متغیر بود. بیش‌ترین شباهت بین ژنوتیپ‌های IR73688-57-2 و IR73694-41-2 (۰/۹۹) و ژنوتیپ IR72944-1-2-2 با ژنوتیپ‌های IR73688-57-2 و IR73694-41-2 (۰/۹۹) بود. این سه ژنوتیپ IRR1 شباهت زیادی با هم داشتند. سه هیبرید حاصل از تلاقی بینام با این سه ژنوتیپ IRR1 نیز شباهت زیادی با هم

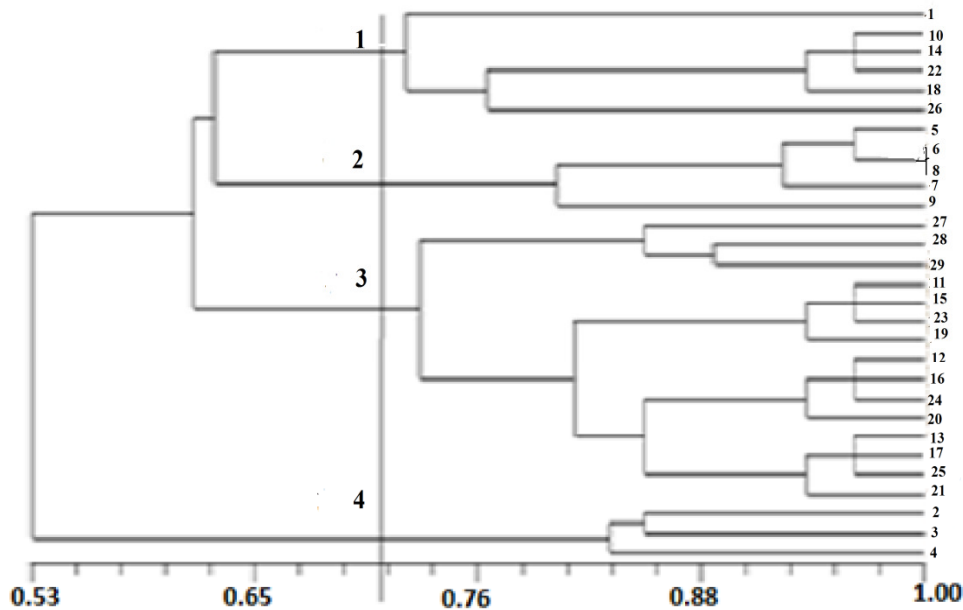
با سه ژنوتیپ دیگر IRRI متفاوت بود. اله قلی پور و همکاران (Allah gholipur *et al.*, 2011) نیز در بررسی که بر روی این هیبریدها انجام دادند، هیبریدهای حاصل از تلاقی ژنوتیپ PR با ژنوتیپ‌های ایرانی را متفاوت از بقیه هیبریدها گزارش کردند.

به منظور بررسی پراکنش پرایمرهای مورد بررسی در ژنوم از تجزیه به مختصات اصلی استفاده شد که در مجموع سه مؤلفه اول توانستند مجموعاً ۶۰/۶۸ درصد از واریانس کل را توجیه کنند. دو مؤلفه اول مجموعاً، ۴۵/۹۷ درصد از واریانس کل را توجیه نمودند که سهم مؤلفه اول ۲۷/۰۲ درصد و سهم مؤلفه دوم ۱۸/۹۵ درصد بود (جدول ۵). به علت استفاده از نشانگرهای اختصاصی در این پژوهش که تعداد محدودی از کروموزوم‌ها را تحت پوشش می‌دهند، بردار اول و دوم حدود ۵۰ درصد از تغییرات مربوط به نشانگرها را توجیه می‌نمایند. بیش‌تر نشانگرهای انتخاب شده بر روی کروموزوم‌های ۴، ۱۲، ۱ واقع شده‌اند. گروه‌بندی اندکی با تجزیه خوشه‌ای متفاوت بود. تفاوت مشاهده شده به دلیل این است که دو مؤلفه اول نمی‌تواند نشان‌دهنده تنوع کل متغیرهای اولیه (تعداد کل باندها) باشد. سلواراج و همکاران (Selvaraj *et al.*, 2010) با تجزیه به مختصات اصلی، ۲۶ رقم برنج را درون سه گروه اصلی قرار دادند و نشان دادند که، بردار اول ۸۹/۲۷ درصد از کل تنوع مشاهده شده را توجیه کرد و سهم بردار دوم و سوم به ترتیب ۶/۰۷ و ۲/۷۲ درصد بود.

(شکل ۲). گروه‌های یک تا چهار به ترتیب شامل ۶، ۵، ۱۵ و ۳ ژنوتیپ بودند. صحت گروه‌بندی حاصل از تجزیه خوشه‌ای توسط تابع تشخیص کانونی به روش خطی فیشر با ۹۳/۱ درصد تأیید شد. نشانگرهای مورد استفاده توانستند والدین ایرانی و IRRI و هیبریدهایشان را به خوبی از هم تفکیک کنند. گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها تاحدی با منشأ جغرافیایی آن‌ها همخوانی داشت، به طوری که ژنوتیپ‌های بینام، دم‌سیاه و هاشمی با منشأ ایرانی در یک گروه قرار گرفتند. ژنوتیپ‌های IR72944-1-2-2، IR76687-22-1-1، IR73694-41-2، IR73688-57-2-3-2-5 و PR27137-30R15 با منشأ IRRI در گروه دیگر قرار گرفتند. ژنوتیپ حسنی با ۵ هیبرید حاصل از تلاقی آن با ۵ ژنوتیپ IRRI در یک گروه مجزا قرار گرفتند. همچنین ۱۵ هیبرید حاصل از تلاقی ژنوتیپ‌های بینام، دم‌سیاه و هاشمی با ۵ ژنوتیپ IRRI (IR72944-1-2-2، IR73688-57-2-1-2-2، IR73694-41-2، IR76687-22-1-3-2-5 و PR27137-30R153) در گروه دیگر قرار گرفتند. این گروه به دو زیر گروه تقسیم شد. هیبریدهای حاصل از تلاقی IR76687-22-1-3-2-5 با ژنوتیپ‌های ایرانی هاشمی، دم سیاه و بینام در زیر گروه اول قرار گرفتند. هیبریدهای حاصل از تلاقی ژنوتیپ بینام با چهار ژنوتیپ IRRI (IR72944-1-2-2، IR73688-57-2، IR73694-41-2 و PR27137-30R153) و هیبریدهای حاصل از تلاقی ژنوتیپ‌های دم سیاه و هاشمی با این چهار ژنوتیپ IRRI در زیر گروه دوم قرار گرفتند. در زیر گروه دوم هیبریدهای حاصل از تلاقی بین بینام، دم سیاه و هاشمی با ژنوتیپ PR با تلاقی بین این سه ژنوتیپ ایرانی

جدول ۵- درصد واریانس و درصد تجمعی واریانس برای ۷ مولفه اول برای نشانگرهای SSR
Table 5. The Percentage and cumulative percentage variance for the first 7 components by SSR markers

مؤلفه No. of coordinate	ریشه مشخصه Eigen value	واریانس (%) Variance (%)	واریانس تجمعی (%) Cumulative variance (%)
1	2.51	27.02	27.02
2	1.76	18.95	45.97
3	1.37	14.71	60.68
4	1.16	12.48	73.16
5	0.96	10.31	83.47
6	0.62	6.67	90.14
7	0.37	3.99	94.13



شکل ۲- دندروگرام ترسیم شده براساس روش UPGMA و ماتریس تشابه تطابق ساده برای ۲۹ ژنوتیپ (والدین و هیبرید) برنج مورد مطالعه (شماره گذاری براساس جدول ۱).

Figure 2. Dendrogram constructed using UPGMA method and based on the simple matching similarity matrix for 29 rice genotypes (parents and hybrids), (The numbering is according to Table 1).

باند، یک باند مربوط به ژنوتیپ‌های IRRI (متحمل به سرما) و یک باند مربوط به ژنوتیپ‌های ایرانی (حساس به سرما) به راحتی آن‌ها را جدا کردند. RM 7200، RM335 و RM101، RM6770، RM239، RM7003 نیز به خوبی این ژنوتیپ‌ها را از هم جدا کردند و در صورت آزمایش با تعداد ژنوتیپ بیشتر می‌توانند در MAS مورد استفاده قرار گیرند.

پیشنهاد می‌شود با وجود مشاهده تنوع مطلوب در این پژوهش که با تعداد محدود نشانگر به دست آمده، اما بهتر است در تحقیقات بعدی از نشانگرهای بیش‌تری استفاده شود. همچنین از تعداد بیش‌تری از لاین‌های والدی برنج استفاده شود و این نشانگرها در کلیه ارقام برنج بومی و اصلاح‌شده مطالعه شوند و تنوع آن‌ها از نظر نشانگرهای مرتبط با ژن‌های تحمل به سرما بررسی شوند.

نتیجه گیری کلی

نشانگرهای SSR مورد استفاده قادر به گروه‌بندی هتروژیک ژنوتیپ‌ها بودند و توانستند ژنوتیپ‌های ایرانی و IRRI را از هم جدا کنند، همچنین توانستند تنوع بین ژنوتیپ‌های ایرانی و IRRI را هم نشان دهند. ژنوتیپ حسنی نسبت به بقیه ژنوتیپ‌های ایرانی متفاوت‌تر بود و ژنوتیپ‌های IR76687-22-1- و PR27137-30R153 نسبت به بقیه ژنوتیپ‌های IRRI متفاوت‌تر بودند. ژنوتیپ حسنی و ژنوتیپ بینام به ترتیب بیش‌ترین و کم‌ترین شباهت را با ژنوتیپ‌های با منشأ IRRI داشتند. در مجموع هیبریدها شباهت بیش‌تری با ژنوتیپ‌های IRRI داشتند.

نشانگرهای SSR مرتبط با سرما RM292، RM261، RM270، RM263 و RM283 با داشتن دو

References

- Allahgholipour, M., Moradi, F., Nahvi, M., Lotfi, A. and Niyazi, N. 2011. Investigating the population of the generations separating in order to select cold tolerant lines in rice. The Final Report of the Project, Rice Research Institution. (In Persian).
- Andaya, V. C. and Mackill, D. J. 2003. Mapping of QTLs associated with cold tolerance during the vegetative stage in rice. *Journal of Experimental Botany* 392: 2579-2585.
- Andaya, V. C. and Tai, T. H. 2006. Fine mapping of the qcts 12 locus, a major QTL for seedling cold tolerance in rice. *Theoretical and Applied Genetics* 113: 467-475.
- Andaya, V. C. and Tai, T. H. 2007. Fine mapping of the qcts4 locus associated with seedling cold tolerance in rice. *Journal of Molecular Breeding* 20: 349-358.
- Arzani, A. 2004. Breeding field crops (3th ed.). Publication of Isfahan University of Technology. (In Persian).
- Cakir, M., Gupta, S., Platz, G. J., Ablett, G. A., Loughman, R., Emebiri, L. C., Poulsen, D., Li, C. D., Lance, R. C. M., Galwey, N. W., Jones, M. G. K. and Appels, R. 2003. Mapping and validation of the genes for resistance to *Pyrenophora teres f. teres* in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Australian Journal of Agricultural Research* 54: 1369-1377.
- Edrisi maryan, KH. 2011. Expression analysis of cold-induced genes in two rice genotypes by differential display method. M.Sc. dissertation. Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan. (In Persian).
- Ghorbani, H. R. 2009. The study of combining rice lines and varieties using line \times tester. M.Sc. dissertation. Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan. (In Persian).
- Hassibi, P., Moradi, F. and Nabipour, M. 2007. Screening of rice genotypes for low temperature by chlorophyll fluorescence. *Iranian Journal of Field Crop Science* 9: 14-31.
- Jena, K. K. and Mackill, D. J. 2008. Molecular markers and their use in markers-assisted selection in rice. *Crop Science Society of America* 48: 1266-1276.
- Jiang, L., Xun, M., Wang, J. and Wan, J. 2007. QTL analysis of cold tolerance at seedling stage in rice (*Oryza sativa* L.) using recombination inbred lines. *Journal of Cereal Science* 48: 173-179.
- Liu, F., Sun, Ch., Tan, L., Fu, Y., Li, D. and Wang, X. 2003. Identification and mapping of quantitative trait loci controlling cold tolerance of Chinese common wild rice at booting to flowering stages. *Journal of Chinese Science Bulletin* 19: 2068-2071.
- Longzhi, H., Yongli, Q., Sanyuan, Z., Cuilan, C., Joughwan, K., Kyuseong, L. and Hee jong, K. 2007. Identification quantitative trait loci for cold response of seedling vigor traits in rice. *Journal of Genetics and Genomics* 34 (3): 239-249.
- Lou, Q., Chen, L. S., Samizadeun, Z., Xing, Y., Li, J., Xu, X., Mei, H. and Luo, L. 2007. A major QTL associated with cold tolerance at seedling stage in rice. *Euphytica* 158: 87-94.
- Lu, C. F., Shen, L. H., Tan, Z. B., Xu, Y. B., He, P., Chen, Y. and Zhu, L. H. 1997. Comparative mapping of QTLs for agronomic traits of rice across environments by using a doubled-haploid population. *Theoretical and Applied Genetics* 94: 145-150.
- Naghavi, M. R., Ghariazi, B. and Hosseini Salekdeh, G. 2009. Molecular markers. Tehran University Press. (In Persian).
- Roawake, A. L., Ishii, T., Yoshida, S. and Nakamura, C. 2008. Mapping of quantitative trait loci associated with cold tolerance at the post germination stage in rice. *Journal of Biotechnology and Biotechnology- EQ*: 536-540
- Rohlf, F. J. 1998. NTSYSpc. Numerical taxonomy and multivariate analysis system. Ver. 2.0. User Guide. Applied Biostatistics Inc., 3 Heritage Lane, Setauket, New York.
- Saghai Maroof, M. A., Biyashev, R. M., Yang, G. P., Zhang, Q. and Allard, R. W. 1994. Extraordinarily polymorphic microsatellite DNA in barely species diversity chromosomal location. And population dynamics. *Proceeding of National Academy of Sciences, USA* 91: 5466-5570.
- Selvaraj, I., Nagarajan, P., Thiyagarajan, K. and Bharathi, M. 2010. Predicting the relationship between molecular marker heterozygosity and hybrid performance using RAPD markers in rice (*oryza sativa* L.). *African Journal of Biotechnology* 9 (45): 7641-7653.
- Shen, S. Q., Zeng, Y. W., Li, S. C., Wen, G. S. and Pu, X. Y. 2005. Mapping cold tolerance gene by near-isogenic lines at booting stage in japonica rice. *Chinese Journal of Rice Science* 19: 217-222.

- Sokal, R. R. and Michener, C. D. 1958.** A statistical method for evaluating systematic relationships. **University of Kansas Science Bulletin** 38: 1409-1438.
- Temnykh, S., DeClerck, G., Lukashova, A., Lipovich, L., Cartinhour, S. and McCouch, S. 2001.** Computational and experimental analysis of microsatellites in rice (*Oryza sativa* L.): Frequency, length variation, transposon associations, and genetic marker potential. **Genome Research** 11: 1441-1452.
- Zhang, Z. H., Su, L., Li, W., Chen, W. and Zhu, Y. G. 2004.** Major QTL conferring cold tolerance at early seedling stage using recombinant inbred lines of rice. **Journal of Plant Science** 168 (2): 527-534.

Archive of SID

The isolation and identification of some rice (*Oryza sativa* L.) lines and hybrids using molecular markers associated with cold tolerance

Fatemeh Chamani Mohasses¹, Habibollah Samizadeh Lahiji^{2*}, Mohammad Mehdi Sohani³,
Babak Rabiei² and Soheila Talesh Sasani⁴

1, 2 and 3. Former Graduate Student, Assoc. Profs. and Assist. Prof., respectively, Dept. of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, 4. Staff Member, Dept. of Horticulture, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan

(Received: August 14, 2012 - Accepted: February 4, 2013)

Abstract

In this study, 24 SSR markers associated with QTL controlling cold tolerance and four markers associated with cold genes were used to determine the genetic affinity of nine parental lines (including four Iranian susceptible lines and five tolerant IRRI lines) and their 20 hybrid combinations to cold stress. The Evaluation of relationship between SSR markers associated with QTLs controlling cold tolerance with susceptible and tolerant genotypes indicated that RM292, RM261, RM270, RM263, RM283, RM7200, RM7003, RM239, RM6770, RM101 and RM335 were able to separate four Iranian susceptible genotypes from five IRRI tolerant genotypes. Hassani and Binam genotypes had the most and the least similarity with IRRI genotypes, respectively. Markers associated with cold genes didn't show any polymorphism between parents. Among the 24 used SSR markers, 18 markers were polymorph that amplified 51 polymorphic bands. The maximum band number (six and five) was produced by RM84 and RM202, respectively. The minimum band number (two) was produced by RM335, RM292, RM420, RM341, RM261, RM270 and RM283. PIC value for SSR primers varied from 0.25 to 0.40. Cluster analysis using UPGMA based on SSR markers and simple matching coefficient separated 9 parental lines and their 20 hybrid combinations into four groups, including 6, 5, 15 and 3 genotypes, respectively. Totally, hybrids were more similar to the IRRI genotypes. Results of canonical discriminant function Analysis using the Fisher's linear method showed that the UPGMA method separated the genotypes with the 93.1 % accuracy.

Keywords: Cluster analysis, Cold tolerance, Fisher's linear discriminant function analysis, Simple matching coefficient, SSR markers

*Corresponding author: hsamizadeh@yahoo.com