

شناسایی ژن‌ها و نشانگرهای مولکولی مرتبط با مؤلفه‌های جوانه‌زنی در رگه‌های F₉ برنج تحت تنش اسمزی

عباس صابری کوچصفهانی^۱، عاطفه صبوری^{۲*}، امین عابدی^۳، علی اعلمی^۴ و تیمور رضوی پور^۵

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت

۲- دانشیار، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت

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

۴- دانشیار، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت

۵- استادیار، موسسه تحقیقات برنج کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، رشت

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۵/۰۴ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۶/۲۴)

چکیده

برنج نسبت به سایر غلات به آب بیشتری برای رشد و نمو نیاز دارد بنابراین تنش‌های آبی خسارت بیشتری به آن وارد می‌کند و لذا بهبود ارقام برنج برای تحمل به تنش‌های محیطی ضروری است. در این آزمایش ۱۵۴ رگه خویش‌آمیخته نوترکیب برنج نسل F₉ حاصل از تلاقی ارقام شاه‌پسند و IR28 در سه شرایط (بدون تنش، تنش اسمزی ۰/۳- و ۰/۶-) مگاپاسکال حاصل از پلی‌اتیلن گلیکول) به صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی مورد بررسی قرار گرفتند. برای آزمایش مولکولی، چندشکلی ۱۱۰ نشانگر SSR و EST-SSR بین والدین جمعیت ارزیابی شدند و از بین آن‌ها، ۴۱ نشانگر چندشکل انتخاب شدند. تجزیه رگرسیون ارتباط بین مؤلفه‌های جوانه‌زنی و نشانگرهای مولکولی نشان داد بیشترین ضریب تبیین در شرایط بدون تنش مربوط به نشانگر RM211 برای ضریب آلومتریک (۱۷ درصد)، در ۰/۳- مگاپاسکال مربوط به RMES10-1 برای وزن خشک ساقه‌چه (۱۸ درصد) و در ۰/۶- مگاپاسکال مربوط به RM273 برای یکنواختی جوانه‌زنی (۲۲/۷ درصد) بود. نشانگرهای RM452، RM3496 و RMES6-1 در این سه محیط، به ترتیب با شش، سه و هشت صفت، بیشترین تعداد ارتباط معنی‌دار با مؤلفه‌های جوانه‌زنی را نشان دادند و می‌توانند کاندید مناسبی جهت بهبود هم‌زمان چند صفت در برنامه‌های به‌نژادی انتخاب به کمک نشانگر باشند. همچنین پس از شناسایی نشانگرهای معنی‌دار مرتبط با مؤلفه‌های جوانه‌زنی، نزدیک‌ترین ژن‌ها به این نشانگرها به صورت بیوانفورماتیکی شناسایی و بیان آن‌ها با استفاده از پایگاه داده ترانسکریپتوم برنج بررسی شد. بر این اساس، بالاترین الگوی بیان تحت تنش خشکی مربوط به مکان ژنی LOC_Os01g57220 و در شرایط بدون تنش مربوط به مکان ژنی LOC_Os01g26039 شناسایی شد که می‌توان از این اطلاعات در برنامه‌های به‌نژادی استفاده کرد.

واژگان کلیدی: انتخاب به کمک نشانگر، تنش‌های محیطی، نشانگرهای ریزماهواره

* نویسنده مسئول، آدرس پست الکترونیکی: a.sabouri@guilan.ac.ir

مقدمه

برنج (*Oryza sativa* L.) به عنوان یکی از مشهورترین غلات، غذای اصلی بخش بزرگی از جمعیت جهان می‌باشد، به طوری که بیش از ۷۰ درصد کالری مصرفی روزانه فقیرترین مردم دنیا را تأمین می‌نماید (Segal and Le, 2019; Nguyet, 2019).

خشکی از جمله مهمترین مشکلات موجود برای تولید محصولات زراعی به‌ویژه 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). از آن جایی که برنج نسبت به سایر غلات به کمبود آب حساس‌تر بوده و به آب بیشتری برای رشد و نمو نیاز دارد، افزایش نمک‌های قابل حل در آب آبیاری و در محلول خاک که باعث ایجاد تنش‌های محیطی می‌شود، خسارت بیشتری نسبت به سایر غلات به آن وارد می‌نماید (Zheng et al., 2016). در جهان برای غلبه بر این چالش بزرگ از دو روش کلی استفاده می‌شود؛ اولین روش، تغییر در شرایط محیطی رشد گیاه که شامل بهبود خاک زراعی و همچنین اصلاح آب آبیاری است که به منابع مالی زیادی نیاز دارد و اما دومین روش، شناسایی ارقام مقاوم به تنش و پرمحصول با استفاده از مهندسی ژنتیک یا روش‌های به‌نژادی سنتی و معرفی این ارقام به کشاورزان می‌باشد که این روش در مجموع برای کشاورزان مقرون به‌صرفه‌تر خواهد بود (Kavousi, 2001). لذا نیاز ضروری به توسعه ارقام متحمل به تنش‌های محیطی با عملکرد قابل قبول وجود دارد.

بدیهی است اساس و پایه برنامه‌های به‌نژادی مولکولی از جمله انتخاب به کمک نشانگر^۱ (MAS) در ایجاد تحمل به تنش‌های محیطی، آگاهی از نواحی ژنومی کنترل کننده آن‌هاست که موجب صرفه‌جویی در زمان و کاهش هزینه‌های برنامه‌های به‌نژادی می‌شود (Rabiei and Sabouri, 2008). از نشانگرهای SSR به‌طور گسترده در تعیین فاصله یا قرابت ژنتیکی بین ژنوتیپ‌ها (Nasiri et al.,

2018)، مکان‌یابی ژن‌های کنترل‌کننده صفات کمی، تهیه نقشه ژنومی و تجزیه پلی‌ژنیک صفات مختلف کمی در گیاهان زراعی استفاده می‌شود (Millan et al., 2006).

از مهمترین نیازمندی‌های چنین مطالعاتی، وجود یک جمعیت مناسب با حداکثر تنوع ژنتیکی برای صفاتی است که مکان‌یابی آن‌ها مدنظر می‌باشد (Mohammadi et al., 2020) و جمعیت رگه‌های خویش‌آمیخته نوترکیب، علاوه بر اینکه بستری ایده‌آل برای مکان‌یابی می‌باشند، چون از لحاظ ژنتیکی هموزیگوت بوده و بذور آن‌ها می‌تواند تکثیر شده و در نتیجه امکان اجرای آزمایشات چندگانه به‌صورت چندسال و چندمکان را فراهم می‌آورند، یک جمعیت پایدار ژنتیکی نیز محسوب می‌شود (Collard et al., 2017). از جمله مطالعاتی که از جمعیت رگه‌های خویش‌آمیخته نوترکیب در مکان‌یابی صفات برنج استفاده شده است می‌توان به مطالعه ونگ و همکاران (Wang et al., 2011) اشاره کرد. این محققین با استفاده از ۲۱۵ رگه خویش‌آمیخته نوترکیب حاصل از تلاقی ارقام R9308 × XieqingzaoB توانستند یک QTL مرتبط با طول ریشه (qRL7) شناسایی کنند. این QTL بر روی کروموزوم ۷ و در فاصله بین دو نشانگر RM3859 و RM214 قرار دارد. سپس با استفاده از BC3F3 مکان دقیق QTL مذکور را در فاصله ۶۵۷/۳۵kb بین دو نشانگر InDel11 و InDel17 تعیین نمودند (Wang et al., 2011).

مکان‌یابی صفات مرتبط با جوانه‌زنی توسط صبوری و همکاران (Sabouri et al., 2010) با استفاده از یک جمعیت ایرانی مشتق از تلاقی طارم محلی (متحمل به تنش اسمزی) و خزر (حساس به تنش اسمزی) انجام شد و چندین QTL بزرگ‌اثر برای صفات مهمی از جمله سرعت جوانه‌زنی و موفولوژی ریشه‌چه شناسایی شد. همچنین سریویدیا و همکاران (Srividhya et al., 2011) با استفاده از یک جمعیت رگه‌های خویش‌آمیخته نوترکیب حاصل از تلاقی IR64 × INRC10192 جهت مکان‌یابی QTL‌های کنترل کننده صفات مرتبط با تحمل به تنش اسمزی و خشکی حاصل از پلی‌اتیلن گلیکول در مرحله گیاهچه‌ای استفاده

1- Marker assisted selection (MAS)

ژنومیکس دانشکده علوم کشاورزی دانشگاه گیلان اجرا شد. آزمایش در سه شرایط (بدون تنش، تنش اسمزی ۰/۳- و ۰/۶- مگاپاسکال حاصل از پلی اتیلن گلیکول) انجام شد. در هر واحد آزمایشی ۵۰ عدد بذر سالم قرار گرفت. این بذور ابتدا با استفاده از محلول ۵ درصد هیپوکلریت سدیم به مدت ۳۰ ثانیه ضدعفونی و سپس سه بار با آب مقطر شستشو شدند. برای شرایط بدون تنش به مقدار ۵ میلی‌لیتر آب مقطر به بذرها موجود روی کاغذ صافی در پتری‌دیش اضافه گردید برای تهیه این محلول‌های اسمزی ۰/۳- و ۰/۶- مگاپاسکال، از پلی اتیلن گلیکول ۶۰۰۰ بر اساس روش میشل و کافمن (Michel and Kaufman, 1973) استفاده شد. مقادیر مورد نیاز پلی اتیلن گلیکول برای تهیه محلول با پتانسیل اسمزی ۰/۳- و ۰/۶- در دماهای مختلف در جدول ۱ آورده شده است (جدول ۱).

پتری دیش‌ها داخل انکوباتور با دمای 1 ± 29 سانتی‌گراد قرار داده شدند. برای انجام آزمون استاندارد جوانه‌زنی، شمارش بذرهاى جوانه زده در ۲۴، ۴۸، ۷۲، ۹۶، ۱۲۰، ۱۴۴ و ۱۶۸ ساعت و بیشتر پس از آغاز آزمایش تا زمان تثبیت بذور جوانه‌زده به مدت ۳ روز انجام شد (Djanaguiraman et al., 2004). معیار جوانه‌زنی بذر، خروج ریشه‌چه بذور حداقل ۲ میلی‌متر در نظر گرفته شد (Willenborg et al., 2005). پس از پایان ثبت جوانه‌زنی، طول ریشه‌چه و ساقه‌چه تمامی گیاهچه‌های داخل پتری دیش با خط‌کش مدرج اندازه‌گیری و در نهایت میانگین هر واحد آزمایشی محاسبه شد.

کردند و موفق به شناسایی چندین QTL برای ساقه‌چه و ریشه‌چه شدند. همچنین میرعرب رضی و همکاران (Mirarab-Razi et al., 2019) رگه‌های خویش‌آمیخته نوترکیب مشتق از ارقام برنج طارم محلی × خزر، را مورد بررسی قرار دادند و پاسخ رگه‌ها را در شرایط مختلف تنش شوری از لحاظ صفات مختلف گیاهچه‌ای مورد بررسی قرار دادند. همچنین جعفرزاده و همکاران (Jafarzadeh-Razmi et al., 2020) با استفاده از جمعیت رگه‌های اینبرد نوترکیب F₉ حاصل از تلاقی ارقام ایرانی طارم × سپیدرود، توانستند یک QTL پایدار و بزرگ اثر (qGW-1) برای افزایش وزن دانه برنج شناسایی کنند. با توجه به اهمیت تحقیقات به‌نژادی در راستای تولید ارقام بهبود یافته متحمل به تنش‌های محیطی، مطالعه حاضر با هدف شناسایی نشانگرهای مولکولی مرتبط با مؤلفه‌های جوانه‌زنی در گیاه برنج تحت تنش اسمزی، با استفاده از جمعیت رگه‌های خویش‌آمیخته نوترکیب حاصل از تلاقی ارقام شاه‌پسند و IR28 طراحی شد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی آزمایش حاضر، شامل ۱۵۴ رگه خویش‌آمیخته نوترکیب برنج نسل F₉ حاصل از تلاقی ارقام شاه‌پسند و IR28 بودند. 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). ارزیابی مؤلفه‌های جوانه‌زنی رگه‌ها، به‌صورت یک آزمایش فاکتوریل با دو فاکتور رگه و تنش اسمزی در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار در آزمایشگاه

جدول ۱- مقادیر پلی اتیلن گلیکول (گرم در لیتر) برای ایجاد پتانسیل‌های محلول اسمزی بر اساس روش میشل-کافمن (۱۹۷۳)

Table 1. Amount of polyethylene glycol-6000 (gr.L⁻¹) to prepare osmotic potentials solution based on Michel-Kaufman (1973)

پتانسیل اسمزی (مگاپاسکال) Osmotic potential (MP)	دمای جوانه‌زنی (سانتی‌گراد) Germination temperature (°C)						
	5	10	15	20	25	30	35
-0.3	122.791	129.001	135.793	143.181	151.407	160.537	170.677
-0.6	188.153	195.995	204.45	213.64	224.0	235	247

پس از ثبت داده‌ها، ابتدا مفروضات تجزیه واریانس آزمون شد. با توجه به نتایج به‌منظور نرمال کردن توزیع اشتباهات آزمایشی برای صفات وزن خشک ریشه‌چه، وزن خشک ساقه‌چه و ضریب آلومتریک از تبدیل لگاریتمی $(x + 1.5) \log_{10}$ استفاده شد.

به‌منظور انجام بخش ارزیابی مولکولی رگه‌ها، با توجه به اینکه تهیه نقشه پیوستگی و مکان‌یابی QTL مستلزم هزینه بالایی است، لذا تحقیق حاضر صرفاً با هدف شناسایی نشانگرهای آگاهی بخش مرتبط با مؤلفه‌های جوانه‌زنی، طراحی شد. در این راستا بر اساس نتایج بررسی‌های فنوتیپی کلیه افراد جمعیت، تعداد ۴۰ رگه انتخاب شد. این انتخاب به گونه‌ای انجام شد که تنوع لازم و کافی در بین رگه‌ها برای انجام تجزیه رگرسیون با دقت بالا و اریب کمتر وجود داشته باشد و تا حد امکان از پتانسیل جمعیت رگه‌های خویش‌آمیخته موجود استفاده شود.

پس از تهیه نمونه از برگ‌های تازه و جوان، استخراج DNA به روش CTAB (Saghai-Marooft *et al.*, 1994) انجام شد و سپس به‌ترتیب با استفاده از ژل آگارز ۱ درصد و دستگاه ناندراپ، کیفیت و کمیت تقریبی DNAهای ژنومی استخراج شده، تعیین شد. برای انجام آزمایش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز ابتدا نشانگرهای مولکولی چندشکل با ارزیابی ۱۱۰ نشانگر SSR^۱ و EST-SSR بر روی DNA والدین جمعیت (شاه‌پسند و IR28) انجام شد. از این تعداد، ۴۱ نشانگر، واجد نوارهای DNA کاملاً واضح و چندشکل بین دو والد تشخیص داده شدند و از آن‌ها برای تعیین ژنوتیپ کلیه افراد جمعیت استفاده شد (جدول ۲). اجزای تشکیل دهنده واکنش PCR در حجم ۱۰ میکرولیتر شامل ۲ میکرولیتر DNA، ۵ میکرولیتر آب استریل دیونیزه، ۱ میکرولیتر بافر PCR (۱۰X)، ۰/۴۸ میکرولیتر MgCl_۲ (۵۰ میلی‌مولار)، ۰/۶ میکرولیتر dNTP (۲ میلی‌مولار)، ۰/۴ میکرولیتر آغازگر پیشرو (۶۰ نانوگرم در میکرولیتر)، ۰/۴ میکرولیتر آغازگر برگشتی (۶۰ نانوگرم در میکرولیتر) و ۰/۱۲ میکرولیتر آنزیم Taq DNA Polymerase (۵ واحد در میکرولیتر) بودند.

بعد از توزین وزن تر و به‌منظور ثبت وزن خشک، ابتدا نمونه‌ها به‌مدت ۲۴ ساعت در آون در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند، سپس توزین انجام شد. با استفاده از روابط ذیل از طریق برنامه (Garmin) Soltani and (Maddah, 2010)، پارامترهای مورد نظر محاسبه شدند:

معادله (۱) درصد جوانه‌زنی

$$\text{درصد جوانه‌زنی} = \frac{Ni}{N} \times 100$$

Ni = تعداد بذرهای جوانه‌زده در روز نام (آخرین روز شمارش جوانه‌زنی) و N = تعداد کل بذر (Camberato and Mccarty, 1999).

معادله (۲) انرژی جوانه‌زنی (Agrawal, 1980):

$$\text{درصد بذرهای جوانه زده در یک دوره خاص} = \frac{\text{انرژی جوانه‌زنی}}{\text{تعداد کل بذرهای آزمون شده}}$$

معادله (۳) شاخص بینه بذر (Abdul-Baki and Anderson, 1973):

$$\text{طول گیاهچه} \times \text{درصد جوانه‌زنی نهایی} = \frac{\text{انرژی جوانه‌زنی}}{100}$$

معادله (۴) درصد آب بافت گیاهچه (Tsonev *et al.*, 1998):

$$100 \times \frac{\text{وزن خشک گیاهچه} - \text{وزن تر گیاهچه}}{\text{وزن تر گیاهچه}} = \text{درصد آب بافت گیاهچه}$$

معادله (۵) ضریب آلومتریک (Hussain, 1989):

$$\text{ضریب آلومتریک} = \frac{\text{میانگین وزن خشک ریشه‌چه}}{\text{میانگین وزن خشک ساقه‌چه}}$$

معادله (۶) سرعت جوانه‌زنی (R₅₀):

$$\text{سرعت جوانه‌زنی} = 1/D50 (R_{50})$$

معادله (۷) یکنواختی جوانه‌زنی (GU):

$$GU = D90 - D10$$

که D90 و D10 به‌ترتیب زمان لازم از کاشت تا رسیدن به ۹۰ و ۱۰ درصد حداکثر جوانه‌زنی است.

1- Expressed sequence tag derived simple sequence repeat

جدول ۲- نام و مشخصات نشانگرهای مولکولی مورد استفاده در تحقیق حاضر

Table 2. Name and information of used molecular markers in present study

شماره	نام	دمای ذوب (°C)	کروموزوم	توالی پیشرو (۵'→۳')	توالی برگشتی (۳'→۵')
Number	Name	Melting temperature (°C)	Chromosome	Forward sequence (5'→3')	Revers sequence (5'→3')
1	RM510	55	6	AACCGGATTAGTTTCTCGCC	TGAGGACGACGAGCAGATTG
2	RM190	55	6	AAGACACAAATAACTGCAGT	GCTTCACTTCTCTGCTTGTG
3	RM1384	55	8	AATGTGGACTAGCTGCCTGC	GTACCGGTATACGGCCCTTC
4	RM3805	55	6	AGAGGAAGAAGCCAAGGAGG	CATCAACGTACCAACCATGG
5	RM12146	55	1	AGTATGCCCTGCCACTACTAGG	CAGCGAATGGCAAGAGCAACC
6	RM589	55	6	ATCATGGTCCGGTGGCTTAAC	CAGGTTCCAAACCAGACACTG
7	RM10843	55	1	CACCTCTTCTGCCTCTATCATGC	GTTTCTTCGCGAAATCGTGTGG
8	RM488	55	1	CAGCTAGGGTTTTGAGGCTG	TAGCAACAACCAGCGTATGC
9	RMES10-1*	55	10	CAGGGGTACTCGTCTACAAGG	TATACCCGGCGAAATACGTC
10	RM10748	55	1	CATCGGTGACCACCTTCTCC	CCTGTCTATCTCTCCCTCAAGC
11	RMES9-2*	55	9	CCACGTTGATAAGCTCATTGC	TGGGCACCGAAAAATAAATC
12	RM212	55	1	CCACTTTCAGCTACTACCAG	CACCATTTGTCTCTCATTATG
13	RM231	55	3	CCAGATTATTTCTGAGGTC	CACTTGCATAGTCTGCATTG
14	RM468	55	3	CCCTTCTTGTGTGGCTAC	TGATTTCTGAGAGCCAACCC
15	RM211	55	2	CCGATCTCTCAACCAACTG	CTTCACGAGGATCTCAAGG
16	RM19367	55	6	CGTCATGTTCGCGGAGGTAAGC	AGGCGTACGTGGAGCAGAGTGC
17	RM452	55	2	CTGATCGAGAGCGTTAAGGG	GGGATCAAACCACGTTTCTG
18	RM12091	55	1	CTGCAATGACAGGAATCAGG	TCTCTCGCCTTTCTTCTCTCC
19	RMES6-1*	55	6	CTGCCACCGGTGTAGCTAGT	TGGTCCCATCGTATATGAAC
20	RM273	55	4	GAAGCCGTCGTGAAGTTACC	GTTTCTACCTGATCGCGAC
21	RM5493	55	8	GACAAAACACAAAGCAGGAC	TAACAAACCAACCAACCAAG
22	RM315	55	1	GAGGTAATTCTCCGTTTCAC	AGTCAGCTCACTGTGCAGTG
23	RM10864	55	1	GAGGTGAGTGAGACTTGACAGTGC	GCTCATCATCCAACCACAGTCC
24	RM6697	55	7	GCAAGATCCAGTCGATTTGG	ATAACATGAGCATCTCCCGG
25	RM10772	55	1	GCACACCATGCAAAATCAATGC	CAGAAACCTCATCTCCACCTTCC
26	RM16030	55	3	GCGAATATGAGCATGCCAACC	GGATTACCTGGTGTGTGCAGTGCC
27	RM279	55	2	GCGGGAGAGGGATCTCTTA	GGGTAGGAGTTAACCTCCGG
28	RM10890	55	1	GCTTCGGCTCTTCATTCACTGG	GCGATTATAGGAGCGCTATGTGG
29	RM10825	55	1	GGACACAAGTCCATGATCCTATCC	GTTTCTTTCCATCCTTGTGTGC
30	RM1287	55	1	GTGAAGAAAGCATGGTAAATG	CTCAGCTTGTGTGTGGTTAG
31	RM493	55	1	TAGCTCCAACAGGATCGACC	GTACGTAACCGCGGAAGGTG
32	RMES5-1*	55	5	TATGATAGCGCTTCGGAGT	GAGATTAACGTGGCCTCCTC
33	RM304	55	10	TCAAACCCGGCACATATAAGAC	GATAGGGAGCTGAAGGAGATG
34	RM1082	55	1	TCATCCGTGGAGCAAGGAGAGG	CCTAGCTAATTGGAGTCCGGTTGG
35	RM302	55	1	TCATGTCTACTACCATCACAC	ATGGAGAAGATGGAATACTTGC
36	RM497	55	2	TCCITTCACCTATGGGTGG	GCCAGTGCTAGGAGAGTTGG
37	RM431	55	1	TCCTGCGAAGCTGAAGAGTTG	AGAGCAAAAACCTGGTTTAC
38	RM10871	55	1	TGAGGCTGTAACGTAGACGATAACC	AAGCCTGTAGAGAGGCGCCAAC
39	RM1384	55	8	TTAATCCATCTGTAGCTGG	TCCGCTATCAACTACCTGC
40	RM521	55	2	TTCCCTTATTCTGTCTCC	GGGATTTGCAGTGAGCTAGC
41	RM7	55	3	TTCGCATGAAGTCTCTCGG	CCTCCATCATTTCTGTGTT

* نشانگرهای EST-SSR با ستاره مشخص شده‌اند.

*EST-SSR markers have been shown with an asterisk

علوم کشاورزی دانشگاه گیلان صورت گرفت. محصول واکنش زنجیره پلی‌مراس با استفاده از دستگاه الکتروفورس افقی و ژل آگاروز ۲ درصد تفکیک شدند و پس با عکس‌برداری با استفاده از دستگاه ژل‌داک، نوارهای DNA، امتیازدهی و تعیین ژنوتیپ شدند. پس از ثبت کلیه داده‌ها، برای تعیین نشانگرهای مولکولی معنی‌دار مرتبط با مؤلفه‌های جوانه‌زنی، از تجزیه رگرسیون با در نظر گرفتن نشانگرها به‌عنوان متغیر مستقل و صفات مورد نظر هر کدام به‌صورت متغیر وابسته به کمک نرم‌افزار SPSS (IBM Crop, 2016) 24 استفاده شد.

عملیات PCR با استفاده از دستگاه ترموسایکلر (Gen Amp, USA) به روش تاج‌داون که شامل یک چرخه واسرشته‌سازی به‌مدت ۴ دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، سپس ۱۰ چرخه شامل ۴۰ ثانیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، ۴۰ ثانیه در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد (با کاهش هر یک درجه سانتی‌گراد برای رسیدن به دمای اتصال) و یک دقیقه دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد بود. سپس ۲۶ چرخه که شامل ۴۰ ثانیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، ۴۰ ثانیه در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد و یک دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد بود و در نهایت یک چرخه بسط نهایی به‌مدت پنج دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد بود که در آزمایشگاه ژنومیکس دانشکده

شناسایی شد. از بین این نشانگرها، RM3496، RM468 و RM211 به ترتیب پنجم، چهارم و چهارم ارتباط معنی‌دار نشان دادند که می‌تواند بیانگر اهمیت این مناطق ژنومی در بروز صفات مرتبط با ساقه‌چه و ریشه‌چه باشد. این نشانگرها به ترتیب روی کروموزوم‌های ۸، ۳ و ۲ برنج قرار دارند. برای صفات مرتبط با جوانه‌زنی شامل درصد تجمعی جوانه‌زنی، انرژی جوانه‌زنی، شاخص بنیه بذر، سرعت جوانه‌زنی، و یکنواختی جوانه‌زنی به ترتیب یک، یک، پنج، سه و دو نشانگر معنی‌دار شناسایی شد که نشانگرهای RM211، RM452 و RM12146 هر کدام با دو صفت ارتباط معنی‌دار نشان دادند (جدول ۳).

در شرایط تنش اسمزی ۰/۳- مگاپاسکال بیشترین ضرایب تبیین به RMES10-1 و RM302 به ترتیب با ۱۸ و ۱۵/۲ درصد در توجیه تغییرات وزن خشک ساقه‌چه و سرعت جوانه‌زنی اختصاص یافت. از میان نشانگرهای واقع بر روی کروموزوم ۲، RM452 با سه صفت وزن تر ساقه‌چه، درصد تجمعی جوانه‌زنی و انرژی جوانه‌زنی بیشترین ارتباط معنی‌دار را با مؤلفه‌های جوانه‌زنی نشان داد. در این محیط، برای وزن تر ساقه‌چه، درصد تجمعی جوانه‌زنی، انرژی جوانه‌زنی و سرعت جوانه‌زنی تنها یک نشانگر معنی‌دار و برای درصد آب بافت گیاهچه، وزن خشک ساقه‌چه و یکنواختی جوانه‌زنی به ترتیب دو، چهار و شش نشانگر آگاهی بخش شناسایی شدند (جدول ۴).

در شرایط تنش اسمزی ۰/۶- مگاپاسکال، RM273 با توجیه ۲۲/۷ درصد از تغییرات یکنواختی جوانه‌زنی بالاترین ضریب تبیین را به خود اختصاص داد. از میان نشانگرها RMES6-1 مرتبط با هشت صفت طول ساقه‌چه، وزن خشک ریشه‌چه، درصد تجمعی جوانه‌زنی، انرژی جوانه‌زنی، شاخص بنیه بذر، درصد آب بافت گیاهچه، سرعت جوانه‌زنی، یکنواختی جوانه‌زنی و RM273 مرتبط با شش صفت طول ساقه‌چه، درصد تجمعی جوانه‌زنی، انرژی جوانه‌زنی، شاخص بنیه بذر، درصد آب بافت گیاهچه، یکنواختی جوانه‌زنی، بیشترین ارتباط معنی‌دار را با مؤلفه‌های جوانه‌زنی در این شرایط داشتند که بیانگر اهمیت این دو نشانگر در شرایط تنش شدید می‌باشد. این نشانگرها به ترتیب روی کروموزوم‌های ۶ و ۴ قرار دارند. (جدول ۵).

در بخش مطالعات بیوانفورماتیکی، ابتدا جایگاه فیزیکی نشانگرهای مورد مطالعه در ژنوم برنج با استفاده از پایگاه داده‌های Gramene و Ricebase تعیین شد (Monaco *et al.*, 2013; Edwards *et al.*, 2016). در مرحله بعد، با ارائه اطلاعات جایگاه فیزیکی نشانگرها به ابزار Genome Browser پایگاه داده Ensembl Plants نزدیک‌ترین ژن‌های بالادست و پایین دست به جایگاه نشانگر هدف شناسایی شد (Bolser *et al.*, 2016). همچنین در مواردی که نشانگر بخشی از یک ژن بود، ژن مورد نظر نیز انتخاب شد. برای دریافت اطلاعات مربوط به ژن‌های شناسایی شده از پایگاه داده RGAP7 (Kawahara *et al.*, 2013) نیز استفاده شد و طی آن برای هر ژن جایگاه کروموزومی، اسم مکان‌ژنی، اسم ژن (در صورت موجود بودن) و توضیحات کارکرد ژن (در صورت وجود) دریافت شد. از داده‌های RNA-seq پایگاه داده RED برای بررسی بیان ژن‌های شناسایی شده در شرایط بدون تنش و تنش خشکی استفاده شد (Xia *et al.*, 2017). رسم نقشه حرارتی با استفاده از نرم افزار TBtools انجام گرفت (Chen *et al.*, 2018).

نتایج و بحث

بر اساس نتایج تجزیه رگرسیونی، در شرایط بدون تنش RM211 با ۱۷ درصد برای ضریب آلومتریک و بعد از آن RM16030 با توجیه ۱۵/۳ درصد از تغییرات طول ساقه‌چه بالاترین ضریب تبیین را به خود اختصاص دادند. نشانگر RM3496 با شش صفت طول ریشه‌چه، وزن تر ریشه‌چه، وزن خشک ریشه‌چه، درصد آب بافت گیاهچه، ضریب آلومتریک، یکنواختی جوانه‌زنی و RM211 با شش صفت طول ریشه‌چه، وزن تر ریشه‌چه، وزن خشک ریشه‌چه، درصد تجمعی جوانه‌زنی، انرژی جوانه‌زنی، ضریب آلومتریک با بیشترین تعداد صفت ارتباط معنی‌دار نشان دادند. نشانگرهای RM452 و RM468 نیز به ترتیب با پنج و چهار صفت در ارتباط بودند. بر اساس نتایج، برای صفات مرتبط با ساقه‌چه و ریشه‌چه شامل طول ریشه‌چه، طول ساقه‌چه، وزن تر ریشه‌چه، وزن خشک ریشه‌چه، وزن تر ساقه‌چه، وزن خشک ساقه‌چه، درصد آب بافت گیاهچه و ضریب آلومتریک به ترتیب سه، پنج، دو، سه، یک، چهار، چهار و چهار نشانگر معنی‌دار و آگاهی‌بخش

جدول ۳- ضریب تبیین و ضریب رگرسیون استاندارد شده بین مؤلفه‌های جوانه‌زنی و نشانگرهای مولکولی در جمعیت رگه‌های خویش‌آمیخته نو ترکیب برنج تحت شرایط بدون تنش

Table 3. Coefficient of determination and standardized regression coefficient between germination components and molecular markers in rice recombinant inbred lines population under normal condition

متغیر	نشانگر	ضریب رگرسیونی	ضریب	سطح
وابسته	معنی‌دار	استاندارد شده	تبیین تصحیح شده	معنی‌داری
Dependent variable	Significant marker	Standardized regression coefficient (B)	Adjusted coefficient of determination (Adjusted R ²)	Significant level
طول ریشه‌چه Radicle length	RM3496	-0.318	8.8	0.031
	RM211	-0.353	7.2	0.018
	RM212	-0.314	7.8	0.035
طول ساقه‌چه Plumule length	RM10829	0.389	9.3	0.004
	RM452	-0.607	11.2	0.000
	RM16030	-0.455	15.3	0.002
	RM304	-0.286	6.6	0.020
	RMES5-1	0.264	5.8	0.034
وزن تر ریشه‌چه Radicle fresh weight	RM211	-0.369	9.3	0.016
	RM3496	-0.327	8.7	0.031
وزن خشک ریشه‌چه Radicle dry weight	RM3496	-0.421	12.7	0.004
	RM211	-0.297	7.4	0.037
	RM468	-0.292	7.0	0.040
وزن تر ساقه‌چه Plumule fresh weight	RM468	-0.342	9.4	0.031
وزن خشک ساقه‌چه Plumule dry weight	RM468	-0.460	8.9	0.002
	RM452	-0.510	7.9	0.001
	RM3805	-0.494	8.2	0.003
	RMES6-1	0.357	10.1	0.051
درصد تجمعی جوانه‌زنی Cumulative germination percentage	RM211	-0.320	7.9	0.044
انرژی جوانه‌زنی Germination energy	RM211	-0.320	7.9	0.044
شاخص بنیه بذر Vigor index	RM452	-0.784	9.9	0.000
	RM16030	-0.466	14.3	0.002
	RM12146	-0.359	9.8	0.005
	RMES6-1	0.290	6.6	0.020
	RM10890	-0.279	5.3	0.042
سرعت جوانه‌زنی Germination rate	RM315	-0.360	9.7	0.015
	RM452	-0.356	6.9	0.017
	RM12146	-0.299	7	0.043
درصد آب بافت گیاهچه Water percentage of seedling tissue	RM468	0.424	13.3	0.001
	RM452	0.405	12.5	0.003
	RM12146	0.313	8.5	0.017
	RM3496	0.292	7.5	0.023
ضریب آلومتریک Allometric coefficient	RM212	-0.473	14.8	0.000
	RM211	-0.428	17	0.001
	RM3496	-0.348	13.4	0.004
	RM493	-0.265	5.9	0.027
یکنواختی جوانه‌زنی Germination uniformity	RMES10-1	-0.356	9.4	0.020
	RM3496	0.306	7.4	0.044

جدول ۴- ضریب تبیین و ضریب رگرسیون استاندارد شده بین مؤلفه‌های جوانه‌زنی و نشانگرهای مولکولی در جمعیت

رگه‌های خویش‌آمیخته نوترکیب برنج تحت تنش اسمزی ۰/۳- مگاپاسکال

Table 4. Coefficient of determination and standardized regression coefficient between germination components and molecular markers in rice recombinant inbred lines population under -0.3MP osmotic stress condition

متغیر وابسته Dependent variable	نشانگر معنی‌دار Significant marker	ضریب رگرسیونی استاندارد شده Standardized regression coefficient (B)	ضریب تبیین تصحیح شده Adjusted coefficient of determination (Adjusted R ²)	سطح معنی‌داری Significant level
وزن تر ساقه‌چه Plumule fresh weight	RM452	-0.330	8.6	0.037
وزن خشک ساقه‌چه Plumule dry weight	RM3805	0.498	9	0.001
	RM1287	-0.760	8.1	0.000
	RMES10-1 RM10748	0.518 0.376	18 6.2	0.001 0.036
درصد تجمعی جوانه‌زنی Cumulative germination percentage	RM452	-0.351	10	0.026
انرژی جوانه‌زنی Germination energy	RM452	-0.351	10	0.026
درصد آب بافت گیاهچه Water percentage of seedling tissue	RM3805	-0.487	14.7	0.002
	RM488	-0.317	7.7	0.035
سرعت جوانه‌زنی Germination rate	RM302	0.416	15.2	0.008
	RM279	0.346	13.6	0.001
	RM521	0.391	12.1	0.000
	RM488	0.446	11.7	0.000
	RM7	0.515	6.1	0.000
	RMES9-2 RM16030	0.362 -0.311	11.5 8.8	0.002 0.004

مؤلفه‌های جوانه‌زنی از جمله سرعت و درصد جوانه‌زنی در استقرار بذر و رشد گیاهچه بسیار حائز اهمیت است، همچنین یکنواختی جوانه‌زنی، انرژی جوانه‌زنی، میزان رشد گیاهچه در مراحل بعدی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار می‌باشند (Fazeli *Kakhki et al.*, 2015).

اثر آبی تنش شوری، ایجاد تنش اسمزی و خشکی فیزیولوژیکی است که گیاهان حتی با وجود آب تجربه می‌کنند (Solis *et al.*, 2017). در مطالعه‌ای بر روی یک جمعیت ایرانی مشتق از تلاقی طارم محلی (متحمل به تنش اسمزی) و خزر (حساس به تنش اسمزی) QTLهای مرتبط با سرعت جوانه‌زنی (qGR-1b) در فاصله نشانگری RM237-

با توجه به اینکه هر چقدر ضریب تبیین برای نشانگری بالاتر باشد، نشاندهنده قدرت ارتباط بالاتر بین آن و صفت مورد نظر است لذا می‌تواند کاندید مناسبی جهت بررسی‌های بیشتر و امکان استفاده از آن‌ها در برنامه‌های به‌نژادی باشد. همچنین در مطالعات مکان‌یابی، شناسایی نشانگرهایی که همزمان با چندین صفت مهم مرتبط باشند، از اهمیت بیشتری در مقایسه با نشانگرهای دیگر برخوردار است، چون می‌تواند امکان گزینش همزمان چند صفت را فراهم نماید. به همین علت شناسایی چنین نشانگرهایی در برنامه‌های به‌نژادی مرتبط با بهبود مؤلفه‌های جوانه‌زنی برنج بسیار کاربردی و حائز اهمیت است (Tuberosa *et al.*, 2002). تحت تنش‌های محیطی،

تحقیق ورما و همکاران (Verma *et al.*, 2014) ارتباط معنی‌دار با عملکرد در شرایط تنش خشکی نشان داد. به‌طور مشابهی نشانگر RM431 که در مطالعه حاضر توانست در شرایط ۰/۶- مگاپاسکال با دو صفت طول ساقه‌چه و شاخص بنه بذر به‌ترتیب با توجیه ۱۲/۴ و ۱۴/۸ درصد از تغییرات، ارتباط معنی‌داری داشته باشد، در تحقیق ویکرام و همکاران (Vikram *et al.*, 2011) ارتباط معنی‌داری با عملکرد تحت تنش خشکی داشت.

در تحقیق مشابهی، سریویدیا و همکاران (Srividhya *et al.*, 2011) از یک جمعیت رگه‌های خویش‌آمیخته نوترکیب حاصل از تلاقی IR64 × INRC10192 جهت مکان‌یابی QTL‌های کنترل‌کننده صفات مرتبط با تحمل به تنش اسمزی و خشکی حاصل از پلی‌اتیلن گلیکول در مرحله گیاهچه‌ای استفاده کردند. آن‌ها در شرایط بدون تنش، برای طول ساقه‌چه یک QTL در حدفاصل نشانگرهای RM1-RM495 روی کروموزوم ۱ شناسایی کردند که ۱۸/۴ درصد از تغییرات این صفت را توجیه نمود و برای طول ریشه‌چه، دو QTL در حدفاصل نشانگرهای RM251-RM218 و RM218-RM7 روی کروموزوم ۲ ردیابی کردند که به‌ترتیب ۱۱/۷ و ۱۱/۵ درصد از تغییرات این صفت را توجیه نمود. این QTL‌ها در شرایط وجود تنش، شناسایی نشدند، در مقابل در محیط تحت تنش برای وزن خشک ساقه‌چه و ریشه‌چه به‌ترتیب سه و چهار QTL شناسایی کردند. مهم‌ترین آن‌ها، یک QTL روی کروموزوم ۱ برای وزن خشک ریشه‌چه بود که ۲۵/۹ درصد از تغییرات فنوتیپی صفت را توجیه کرد و در حدفاصل RM1-RM495 قرار داشت. آن‌ها بین QTL‌های شناسایی شده در شرایط بدون تنش و تنش حاصل از پلی‌اتیلن گلیکول، فقط در یک مورد اشتراک مشاهده کردند که مربوط به نسبت ساقه‌چه به ریشه‌چه بود. شایان ذکر است در تحقیق حاضر نیز این نتیجه قابل مشاهده است و نشانگرهای پیوسته مشترک در سه محیط نسبت به نشانگرهای اختصاصی در هر محیط کمتر بودند.

RM246 روی کروموزوم ۱ و طول ریشه‌چه (qRL-12a) در فاصله نشانگری RM1337-RM7626 روی کروموزوم ۱۲ در تنش اسمزی حاصل از سوریتول ردیابی شدند که به‌ترتیب ۲۳ و ۲۵ درصد از تغییرات فنوتیپی را توجیه کردند (Sabouri *et al.*, 2010). در تحقیق حاضر نیز دو نشانگر معنی‌دار RM12146 و RM315 مرتبط با سرعت جوانه‌زنی بر روی کروموزوم ۱ شناسایی شدند. کروموزوم ۱ با توجه به اینکه واجد QTL‌های بزرگ اثر مهمی در ارتباط با کنترل صفات مرتبط با تنش شوری در برنج است، از اهمیت زیادی برخوردار است. از جمله QTL‌های بزرگ اثر مهمی که تاکنون در ارتباط با تنش شوری در مراحل مختلف رشدی برنج مورد شناسایی قرار گرفته و در جمعیت‌های مختلف به تأیید رسیده است QTL‌های موسوم به *Saltol* و *SKCI* می‌باشند که روی کروموزوم ۱ واقع شده‌اند و مکان‌یابی دقیق آن‌ها صورت گرفته است (Singh *et al.*, 2007; Thomson *et al.*, 2007). در پژوهش حاضر دو نشانگر RM10748 و RM1287 که ارتباط معنی‌داری با وزن خشک گیاهچه در محیط ۰/۳- مگاپاسکال، نشان دادند و به‌ترتیب ۸/۱ و ۶۲ درصد از تغییرات این صفت را توجیه کردند، در مجاورت *SKCI* قرار دارند. این نتایج می‌تواند بیانگر ارتباط بین مکان‌های ژنی کنترل‌کننده صفات تحت تنش‌های خشکی و شوری باشد. همان‌گونه که هورمون‌هایی مثل اسید آبسزیک در گیاهان می‌توانند نقش کلیدی در پاسخ گیاهان به تنش شوری و خشکی باشند، بی‌تردید در سازوکار مولکولی پاسخ به تنش‌های مذکور نتایج مشابهی در بر خواهد داشت و نسبت به یکدیگر همپوشانی خواهند داشت (Zhang *et al.*, 2006). نشانگر RM488 که در شرایط ۰/۳- مگاپاسکال، ارتباط معنی‌داری با درصد آب بافت گیاهچه و یکنواختی جوانه‌زنی داشت، در مطالعه سوآمی و همکاران (Swamy *et al.*, 2011) ارتباط معنی‌داری با عملکرد در شرایط تنش خشکی نشان داد. همچنین نشانگر RM302 نیز در همین محیط که با ضریب تبیین ۱۵/۲ درصد، سرعت جوانه‌زنی را توجیه نمود، در

جدول ۵- ضریب تبیین و ضریب رگرسیون استاندارد شده بین مؤلفه‌های جوانه‌زنی و نشانگرهای مولکولی در جمعیت رگه‌های خویش‌آمیخته نوترکیب برنج تحت تنش اسمزی ۰/۶- مگاپاسکال

Table 5. Coefficient of determination and standardized regression coefficient between germination components and molecular markers in rice recombinant inbred lines population under -0.6MP osmotic stress condition

متغیر وابسته Dependent variable	نشانگر معنی‌دار Significant marker	ضریب رگرسیونی استاندارد شده Standardized regression coefficient (B)	ضریب تبیین تصحیح شده Adjusted coefficient of determination (Adjusted R ²)	سطح معنی‌داری Significant level
طول ریشه‌چه Radicle length	RM12091	0.417	14.9	0.013
طول ساقه‌چه Plumule length	RMES6-1	0.508	8.9	0.000
	RM431	-0.458	12.4	0.001
	RM452	-0.332	13.3	0.014
	RM273	-0.352	9.7	0.008
وزن تر ریشه‌چه Radicle fresh weight	RM510	-0.285	5.5	0.035
	RM12091	0.448	15.7	0.005
وزن خشک ریشه‌چه Radicle dry weight	RM315	-0.315	7.8	0.044
	RMES6-1	0.371	11.2	0.028
درصد تجمعی جوانه‌زنی Cumulative germination percentage	RM273	-0.448	12.8	0.004
	RM6697	0.392	17	0.006
	RMES6-1	0.444	6.5	0.002
	RM12146	0.414	7.5	0.003
	RM3805	-0.520	5.4	0.004
	RM16030	0.345	6.2	0.015
	RM521	0.231	4.6	0.048
انرژی جوانه‌زنی Germination energy	RM273	-0.448	12.8	0.004
	RM6697	0.392	17	0.006
	RMES6-1	0.444	6.5	0.002
	RM12146	0.414	7.5	0.003
	RM3805	-0.520	5.4	0.004
	RM16030	0.345	6.2	0.015
	RM521	0.231	4.6	0.048
شاخص بنیه بذر Vigor index	RMES6-1	0.451	9.3	0.000
	RM431	-0.506	14.8	0.000
	RM452	-0.260	12.8	0.042
	RM273	-0.498	10.5	0.000
	RM12146	0.382	10.2	0.008
درصد آب بافت گیاهچه Water percentage of seedling tissue	RMES6-1	-0.421	13.8	0.008
ضریب آلومتریک Allometric coefficient	RM273	0.352	10.4	0.025
	RM315	-0.379	9.8	0.018
	RM12091	0.374	12	0.020
سرعت جوانه‌زنی Germination rate	RMES6-1	0.363	17	0.023
یکنواختی جوانه‌زنی Germination uniformity	RM510	0.331	8.4	0.038
	RM273	-0.516	22.7	0.001
	RMES6-1	0.353	10.7	0.017

۵۱/۴ درصد از تغییرات عملکرد دانه برنج تحت تنش خشکی، توسط نشانگرهای RM7، RM231، RM302،

صابری و همکاران (Sabouri *et al.*, 2019) در بررسی خود نشان دادند در جمعیت رگه‌های خویش‌آمیخته نوترکیب،

شده می‌توانند در ارتقا و بهبود ارقام برنج با استفاده از برنامه‌های به‌نژادی انتخاب به کمک نشانگر بسیار امیدوارکننده باشند (Sabouri et al., 2018; Collard et al., 2017).

با توجه به بررسی‌های بیوانفورماتیک که با استفاده از نشانگرهای معنی‌دار در سه محیط انجام پذیرفت، نزدیک‌ترین ژن‌های بالا دست، پایین دست و یا ژنی که نشانگر در داخل آن قرار داشت، شناسایی شدند. اطلاعات ژن‌های مذکور بر روی کروموزوم‌های ۱، ۲، ۳، ۴، ۶، ۷، ۸ و ۱۰ در جداول ۶، ۷ و ۸ نشان داده شده است.

RM12091 و RM19367 توجیه می‌شود. در پژوهش حاضر سه نشانگر RM7، RM302 و RM12091 در شرایط ۰/۳- و ۰/۶- مگاپاسکال ارتباط معنی‌داری را به ترتیب با یکنواختی جوانه‌زنی؛ طول و وزن تر ریشه‌چه و سرعت جوانه‌زنی نشان دادند. نشانگر RM12091 در سایر مطالعات مرتبط با خشکی نیز به عنوان نشانگر مرتبط با عملکرد و اجزای عملکرد برنج شناسایی شد (Sabouri et al., 2018; Vikram et al., 2011). نشانگرهایی که در چندین محیط و با استفاده از زمینه‌های ژنتیکی مختلف شناسایی می‌شوند به‌عنوان نشانگرهای تأیید

جدول ۶- اطلاعات ژن‌های شناسایی شده مرتبط با نشانگرهایی که در شرایط بدون تنش با مؤلفه‌های جوانه‌زنی برنج ارتباط معنی‌دار داشتند.

Table 6. Information on identified genes related to molecular markers which had significant association with rice germination components under non-stress condition

صفت Trait	نشانگرها Markers	نام مکان‌ژنی Locus names	نام ژن Gene names	جایگاه Location	توضیحات ژن Gene description	
طول ریشه‌چه Radicle length	RM3496	U	LOC_Os08g44230	Chr8: 27,842,259-27,847,633	zinc finger family protein	
		I	---	---	---	
	RM211	D	LOC_Os08g44220	Chr8: 27,834,547-27,838,106	GLTP domain containing protein	
		U	LOC_Os02g04540	Chr2: 2020969-2023488	retrotransposon protein	
	RM212	I	---	---	---	
		D	LOC_Os02g04530	Chr2: 2011707-2018122	rust resistance-like protein RP1	
		U	LOC_Os01g57220	Chr1: 33,059,187-33,065,392	secretory carrier-associated membrane protein	
		I	LOC_Os01g57210	Chr1: 33,050,635-33,058,497	WD40 repeat-containing subunit B1 homolog 1	
طول ساقه‌چه Plumule length	RM10829	D	LOC_Os01g57190	Chr1: 33,044,180-33,044,803	transposon protein	
		U	LOC_Os01g23705	Chr1: 13,342,089-13,342,658	---	
		I	---	---	---	
	RM452	D	LOC_Os01g23700	Chr1: 13,340,275-13,340,721	---	
		U	LOC_Os02g16770	Chr2: 9565903..9568322	---	
	RM16030	I	LOC_Os02g16760	<i>OsFBX4</i> 1	Chr2: 9562677..9563849	F-box domain containing protein
		D	LOC_Os02g16750	---	Chr2: 9559188..9559883	retrotransposon protein
		U	LOC_Os03g57340	---	Chr3: 32708411..3271133	chaperone protein dnaJ
		I	---	---	---	---
		D	LOC_Os03g57330	---	Chr3: 32700604..3270449	IQ calmodulin-binding motif domain containing protein
وزن تر ریشه‌چه Radicle fresh weight	RM304	U	LOC_Os10g34940	Chr10: 18,656,549-18,657,973	---	
		I	---	---	---	
	RM211	D	LOC_Os10g34930	Chr10: 18,640,397-18,641,937	secretory protein	
		U	LOC_Os02g04540	Chr2: 2020969-2023488	retrotransposon protein	
	RM3496	I	---	---	---	
		D	LOC_Os02g04530	Chr2: 2011707-2018122	rust resistance-like protein RP1	
		U	LOC_Os08g44230	Chr8: 27,842,259-27,847,633	zinc finger family protein	
		I	---	---	---	
RM3496	D	LOC_Os08g44220	Chr8: 27,834,547-27,838,106	GLTP domain containing protein		

ادامه جدول ۶
Table 6. Continued

صفت Trait	نشانگرها Markers	نام مکان ژنی Locus names	نام ژن Gene names	جایگاه Location	توضیحات ژن Gene description	
وزن خشک	RM3496	U	LOC_Os08g44230	Chr8: 27,842,259-27,847,633	zinc finger family protein	
		I	---	---	---	
		D	LOC_Os08g44220	Chr8: 27,834,547-27,838,106	GLTP domain containing protein	
ریشه‌چه Radicle dry weight	RM211	U	LOC_Os02g04540	Chr2: 2020969-2023488	retrotransposon protein	
		I	---	---	---	
		D	LOC_Os02g04530	Chr2: 2011707-2018122	rust resistance-like protein RP1	
	RM468	U	LOC_Os03g57300	Chr3:32679834..32691070	TRANSPORT PROTEIN (TRAPP)	
		I	LOC_Os03g57290	Chr3:32672049..32679017	cullin	
		D	LOC_Os03g57280	Chr3:32665994..32671254	N-dimethylguanosine tRNA methyltransferase	
وزن تر ساقه‌چه Plumule fresh weight	RM468	U	LOC_Os03g57300	Chr3:32679834..32691070	TRANSPORT PROTEIN (TRAPP)	
		I	LOC_Os03g57290	Chr3:32672049..32679017	cullin	
		D	LOC_Os03g57280	Chr3:32665994..32671254	N-dimethylguanosine tRNA methyltransferase	
وزن خشک ساقه‌چه Plumule dry weight	RM468	U	LOC_Os03g57300	Chr3:32679834..32691070	TRANSPORT PROTEIN (TRAPP)	
		I	LOC_Os03g57290	Chr3:32672049..32679017	cullin	
		D	LOC_Os03g57280	Chr3:32665994..32671254	N-dimethylguanosine tRNA methyltransferase	
	RM452	U	LOC_Os02g16770	Chr2:9565903..9568322	---	
		I	LOC_Os02g16760	<i>OsFBX41</i>	Chr2:9562677..9563849	F-box domain containing protein
		D	LOC_Os02g16750	---	Chr2:9559188..9559883	retrotransposon protein
	RM3805	U	LOC_Os06g06160	Chr6:2855669..2859561	IQ calmodulin-binding motif domain containing protein	
		I	---	---	---	
		D	LOC_Os06g06150	---	Chr6:2848747..2849506	zinc finger, C3HC4 type domain containing protein
درصد تجمعی جوانه‌زنی Cumulative germination percentage	RM211	U	LOC_Os02g04540	Chr2: 2020969-2023488	retrotransposon protein	
		I	---	---	---	
		D	LOC_Os02g04530	Chr2: 2011707-2018122	rust resistance-like protein RP1	
انرژی جوانه‌زنی Germination energy	RM211	U	LOC_Os02g04540	Chr2: 2020969-2023488	retrotransposon protein	
		I	---	---	---	
		D	LOC_Os02g04530	Chr2: 2011707-2018122	rust resistance-like protein RP1	
	RM452	U	LOC_Os02g16770	Chr2:9565903..9568322	---	
		I	LOC_Os02g16760	<i>OsFBX41</i>	Chr2:9562677..9563849	F-box domain containing protein
		D	LOC_Os02g16750	---	Chr2:9559188..9559883	retrotransposon protein
شاخص بنیه بذر Vigor index	RM16030	U	LOC_Os03g57340	Chr3:32708411..32711331	chaperone protein dnaJ	
		I	---	---	---	
		D	LOC_Os03g57330	---	Chr3:32700604..32704499	IQ calmodulin-binding motif domain containing protein
	RM12146	U	LOC_Os01g70320	Chr1:40723385..40730507	---	
		I	---	---	---	
		D	LOC_Os01g70310	---	Chr1:40714145..40717179	inducer of CBF expression 2
	RM10890	U	LOC_Os01g26060	Chr1:14767283..14769140	---	
		I	LOC_Os01g26039	Chr1:14754773..14764507	alpha/beta-Hydrolases	
		D	LOC_Os01g26020	---	Chr1:14752089..14754630	---

U: بالادست ژن؛ I: خود ژن؛ D: پایین دست ژن

U: Upstream; I: In frame; D: Downstream

ادامه جدول ۶

Table 6. Continued

صفت Trait	نشانه‌ها Markers	نام مکان‌ژنی Locus names	نام ژن Gene names	جایگاه Location	توضیحات ژن Gene description		
درصد آب بافت گیاهچه Water percentage of seedling tissue	RM468	U	LOC_Os03g57300	---	Chr3:32679834..32691070	TRANSPORT PROTEIN (TRAPP)	
		I	LOC_Os03g57290	---	Chr3:32672049..32679017	cullin	
	RM452	D	LOC_Os03g57280	---	Chr3:32665994..32671254	N-dimethylguanosine tRNA methyltransferase	
		U	LOC_Os02g16770	---	Chr2:9565903..9568322	---	
		I	LOC_Os02g16760	<i>OsFBX41</i>	Chr2:9562677..9563849	F-box domain containing protein	
		D	LOC_Os02g16750	---	Chr2:9559188..9559883	retrotransposon protein	
		U	LOC_Os01g70320	---	Chr1:40723385..40730507	---	
		RM12146	I	---	---	---	---
			D	LOC_Os01g70310	---	Chr1:40714145..40717179	inducer of CBF expression 2
		RM3496	U	LOC_Os08g44230	---	Chr8: 27,842,259-27,847,633	zinc finger family protein
D	LOC_Os08g44220		---	Chr8: 27,834,547-27,838,106	GLTP domain containing protein		
ضریب آلومتریک Allometric coefficient	RM212	U	LOC_Os01g57220	---	Chr1: 33,059,187-33,065,392	secretory carrier-associated membrane protein	
		I	LOC_Os01g57210	<i>katanin p80</i>	Chr1: 33,050,635-33,058,497	WD40 repeat-containing subunit B1 homolog 1	
		D	LOC_Os01g57190	---	Chr1: 33,044,180-33,044,803	transposon protein	
		U	LOC_Os02g04540	---	Chr2: 2020969-2023488	retrotransposon protein	
	RM211	I	---	---	---	---	
		D	LOC_Os02g04530	---	Chr2: 2011707-2018122	rust resistance-like protein RP1	
	RM3496	U	LOC_Os08g44230	---	Chr8: 27,842,259-27,847,633	zinc finger family protein	
		D	LOC_Os08g44220	---	Chr8: 27,834,547-27,838,106	GLTP domain containing protein	
	RM493	U	LOC_Os01g21900	---	Chr1:12291788..12294943	---	
		I	LOC_Os01g21880	---	Chr1:12280146..12280526	---	
		D	LOC_Os01g21870	---	Chr1:12270037..12270402	---	
		U	LOC_Os01g63410	---	Chr1:36735951..36737401	---	
سرعت جوانه‌زنی Germination rate	RM315	I	LOC_Os01g63400	---	Chr1:36732836..36737403	PPR repeat containing protein	
		D	LOC_Os01g63393	---	Chr1:36730708..36731031	---	
	RM452	U	LOC_Os02g16770	---	Chr2:9565903..9568322	---	
		I	LOC_Os02g16760	<i>OsFBX41</i>	Chr2:9562677..9563849	F-box domain containing protein	
		D	LOC_Os02g16750	---	Chr2:9559188..9559883	retrotransposon protein	
		U	LOC_Os01g70320	---	Chr1:40723385..40730507	---	
RM12146	I	---	---	---	---		
	D	LOC_Os01g70310	---	Chr1:40714145..40717179	inducer of CBF expression 2		
یکنواختی زنی جوانه Germination uniformity	RM3496	U	LOC_Os08g44230	---	Chr8: 27,842,259-27,847,633	zinc finger family protein	
		D	LOC_Os08g44220	---	Chr8: 27,834,547-27,838,106	GLTP domain containing protein	

U: بالادست ژن؛ I: خود ژن؛ D: پایین دست ژن

U: Upstream; I: In frame; D: Downstream

جدول ۷- اطلاعات ژن‌های شناسایی شده مرتبط با نشانگرهایی که در شرایط تنش اسمزی ۰/۳- مگاپاسکال با مؤلفه‌های جوانه‌زنی برنج ارتباط معنی‌دار داشتند

Table 7. Information on identified genes related to molecular markers which had significant association with rice germination components under -0.3 MPa osmotic stress condition

صفت Trait	نشانگرها Markers	نام مکان ژنی Locus names	نام ژن Gene names	جایگاه Location	توضیحات ژن Gene description	
وزن تر ساقه‌چه Plumule fresh weight	RM452	U	LOC_Os02g16770	---	Chr2:9565903..9568322	---
		I	LOC_Os02g16760	<i>OsFB X41</i>	Chr2:9562677..9563849	F-box domain containing protein
		D	LOC_Os02g16750	---	Chr2:9559188..9559883	retrotransposon protein
وزن خشک ساقه‌چه Plumule dry weight	RM3805	U	LOC_Os06g06160	---	Chr6:2855669..2859561	IQ calmodulin-binding motif domain containing protein
		I	---	---	---	---
		D	LOC_Os06g06150	---	Chr6:2848747..2849506	zinc finger, C3HC4 type domain containing protein
	RM1287	U	LOC_Os01g19190	---	Chr:10853801 - 10859425	retrotransposon protein
		I	---	---	---	---
		D	LOC_Os01g19170	---	Chr1:10830045..10831911	polygalacturonase
RM1074 8	U	LOC_Os01g21100	---	Chr1:11774396..11775010	---	
	I	---	---	---	---	
	D	LOC_Os01g21090	---	Chr:11764595..11762633	retrotransposon protein	
درصد تجمعی جوانه‌زنی Cumulative germination percentage	RM452	U	LOC_Os02g16770	---	Chr2:9565903..9568322	---
		I	LOC_Os02g16760	<i>OsFB X41</i>	Chr2:9562677..9563849	F-box domain containing protein
		D	LOC_Os02g16750	---	Chr2:9559188..9559883	retrotransposon protein
انرژی جوانه‌زنی Germination energy	RM452	U	LOC_Os02g16770	---	Chr2:9565903..9568322	---
		I	LOC_Os02g16760	<i>OsFB X41</i>	Chr2:9562677..9563849	F-box domain containing protein
		D	LOC_Os02g16750	---	Chr2:9559188..9559883	retrotransposon protein
درصد آب بافت گیاهچه Water percentage of seedling tissue	RM3805	U	LOC_Os06g06160	---	Chr6:2855669..2859561	IQ calmodulin-binding motif domain containing protein
		I	---	---	---	---
		D	LOC_Os06g06150	---	Chr6:2848747..2849506	zinc finger, C3HC4 type domain containing protein
	RM488	U	LOC_Os01g43370	<i>CPuO RF17</i>	Chr1: 24808514-24813403	conserved peptide uORF-containing transcript
		I	---	---	---	---
		D	LOC_Os01g43360	---	Chr1: 24792133-24794372	myosin-Ie
سرعت جوانه‌زنی Germination rate	RM302	U	LOC_Os01g57100	---	Chr1: 32996762-32999264	kinase activity
		I	LOC_Os01g57082	---	Chr1: 32984982-32994519	insulin-degrading enzyme
		D	LOC_Os01g57073	---	Chr1: 32965305-32977407	insulin-degrading enzyme
یکنواختی جوانه‌زنی Germination uniformity	RM279	U	LOC_Os02g05850	---	Chr2: 2,887,328-2,892,037	transposon protein
		I	LOC_Os02g05840	<i>VIL2</i>	Chr2: 2,876,553-2,882,177	VERNALIZATION-INSENSITIVE PROTEIN
		D	LOC_Os02g05830	---	Chr2: 2,874,934-2,876,452	ribulose biphosphate carboxylase small chain
	RM521	U	LOC_Os02g18540	---	Chr2:10803654..10812279	uncharacterized Cys-rich domain containing protein
		I	LOC_Os02g18530	---	Chr2:10800144..10802477	REVERSE TRANSCRIPTASES
		D	LOC_Os02g18520	---	Chr2:10792695..10797081	retrotransposon protein
RM488	U	LOC_Os01g43370	<i>CPuO RF17</i>	Chr1: 24808514-24813403	conserved peptide uORF-containing transcript	
	I	---	---	---	---	
	D	LOC_Os01g43360	---	Chr1: 24792133-24794372	myosin-Ie	
	RM7	U	LOC_Os03g17680	---	Chr3:9832662..9833183	---
		I	---	---	---	---
		D	LOC_Os03g17670	---	Chr3:9828148..9828898	---
RM1603 0	U	LOC_Os03g57340	---	Chr3:32708411..32711331	chaperone protein dnaJ	
	I	---	---	---	---	
	D	LOC_Os03g57330	---	Chr3:32700604..32704499	IQ calmodulin-binding motif domain containing protein	

U: بالادست ژن؛ I: خود ژن؛ D: پایین دست ژن

U: Upstream; I: In frame; D: Downstream

جدول ۸- اطلاعات ژن‌های شناسایی شده مرتبط با نشانگرهایی که در شرایط تنش اسمزی ۰/۶- مگاپاسکال با مؤلفه‌های جوانه‌زنی برنج ارتباط معنی‌دار داشتند.

Table 8. Information on identified genes related to molecular markers which had significant association with rice germination components under -0.6 MPa osmotic stress condition

صفت Trait	نشانگرها Markers	نام مکان‌ژنی Locus names	نام ژن Gene names	جایگاه Location	توضیحات ژن Gene description
طول ساقچه Plumule length	RM431	U	LOC_Os01g66980	Chr1: 38,900,545-38,902,752	Trigger factor ribosome-binding zinc finger, C3HC4 type domain containing protein
		I	LOC_Os01g66970	Chr1: 38,893,298-38,897,714	—
		D	LOC_Os01g66960	Chr1: 38,891,151-38,894,746	selenoprotein precursor
	RM452	U	LOC_Os02g16770	Chr2:9565903..9568322	—
		I	LOC_Os02g16760	OsFB X41 Chr2:9562677..9563849	F-box domain containing protein
		D	LOC_Os02g16750	Chr2:9559188..9559883	retrotransposon protein
	RM273	U	LOC_Os04g40475	Chr4: 24052947-24054476	SELENIUM-BINDING PROTEIN
		I	LOC_Os04g40470	Chr4: 24049070-24051142	cytochrome P450
		D	LOC_Os04g40460	Chr4: 24043880-24047054	cytochrome P450
	RM510	U	LOC_Os06g06120	Chr6: 2,832,462-2,836,324	—
وزن تر ریشه‌چه Radicule fresh weight		I	—	—	—
	RM315	U	LOC_Os01g63410	Chr1:36735951..36737401	—
		I	LOC_Os01g63400	Chr1:36732836..36737403	PPR repeat containing protein
	D	LOC_Os01g63393	Chr1:36730708..36731031	—	
درصد تجمعی جوانه‌زنی Cumulative germination percentage	RM273	U	LOC_Os04g40475	Chr4: 24052947-24054476	SELENIUM-BINDING PROTEIN
		I	LOC_Os04g40470	Chr4: 24049070-24051142	cytochrome P450
		D	LOC_Os04g40460	Chr4: 24043880-24047054	cytochrome P450
	RM6697	U	LOC_Os07g03120	Chr7: 1,194,383-1,195,595	—
		I	—	—	—
		D	LOC_Os07g03110	OsFB X213 Chr7: 1,183,280-1,185,666	F-box domain containing protein
	RM12146	U	LOC_Os01g70320	Chr1:40723385..40730507	—
		I	—	—	—
		D	LOC_Os01g70310	Chr1:40714145..40717179	inducer of CBF expression 2
	RM3805	U	LOC_Os06g06160	Chr6:2855669..2859561	IQ calmodulin-binding motif domain containing protein
	I	—	—	—	
	D	LOC_Os06g06150	Chr6:2848747..2849506	zinc finger, C3HC4 type domain containing protein	
RM16030	U	LOC_Os03g57340	Chr3:32708411..32711331	chaperone protein dnaJ	
	I	—	—	—	
	D	LOC_Os03g57330	Chr3:32700604..32704499	IQ calmodulin-binding motif domain containing protein	
RM521	U	LOC_Os02g18540	Chr2:10803654..10812279	uncharacterized Cys-rich domain containing protein	
	I	LOC_Os02g18530	Chr2:10800144..10802477	REVERSE TRANSCRIPTASES	
	D	LOC_Os02g18520	Chr2:10792695..10797081	retrotransposon protein	
	U	LOC_Os04g40475	Chr4: 24052947-24054476	SELENIUM-BINDING PROTEIN	
انرژی جوانه‌زنی Germination energy	RM273	I	LOC_Os04g40470	Chr4: 24049070-24051142	cytochrome P450
		D	LOC_Os04g40460	Chr4: 24043880-24047054	cytochrome P450
		U	LOC_Os07g03120	Chr7: 1,194,383-1,195,595	—
	RM6697	I	—	—	—
		D	LOC_Os07g03110	OsFB X213 Chr7: 1,183,280-1,185,666	F-box domain containing protein
		U	LOC_Os01g70320	Chr1:40723385..40730507	—
	RM12146	I	—	—	—
		D	LOC_Os01g70310	Chr1:40714145..40717179	inducer of CBF expression 2
		U	LOC_Os06g06160	Chr6:2855669..2859561	IQ calmodulin-binding motif domain containing protein
	RM3805	I	—	—	—
	D	LOC_Os06g06150	Chr6:2848747..2849506	zinc finger, C3HC4 type domain containing protein	
	U	LOC_Os03g57340	Chr3:32708411..32711331	chaperone protein dnaJ	
	I	—	—	—	
	D	LOC_Os03g57330	Chr3:32700604..32704499	IQ calmodulin-binding motif domain containing protein	
	U	LOC_Os02g18540	Chr2:10803654..10812279	uncharacterized Cys-rich domain containing protein	
RM521	I	LOC_Os02g18530	Chr2:10800144..10802477	REVERSE TRANSCRIPTASES	
	D	LOC_Os02g18520	Chr2:10792695..10797081	retrotransposon protein	

U: بالادست ژن؛ I: خود ژن؛ D: پایین‌دست ژن

U: Upstream; I: In frame; D: Downstream

ادامه جدول ۸

Table 8. Continued

صفت Trait	نشانگرها Markers	نام مکان ژنی Locus names	نام ژن Gene names	جایگاه Location	توضیحات ژن Gene description	
شاخص بنیه بذر Vigor index	RM431	U	LOC_Os01g66980	---	Chr1: 38,900,545-38,902,752	Trigger factor ribosome-binding
		I	LOC_Os01g66970	---	Chr1: 38,893,298-38,897,714	zinc finger, C3HC4 type domain containing protein
	RM452	D	LOC_Os01g66960	---	Chr1: 38,891,151-38,894,746	selenoprotein precursor
		U	LOC_Os02g16770	---	Chr2:9565903..9568322	---
	RM273	I	LOC_Os02g16760	<i>OsFBX4</i>	Chr2:9562677..9563849	F-box domain containing protein
		D	LOC_Os02g16750	---	Chr2:9559188..9559883	retrotransposon protein
	RM12146	U	LOC_Os04g40475	---	Chr4: 24052947-24054476	SELENIUM-BINDING PROTEIN
		I	LOC_Os04g40470	---	Chr4: 24049070-24051142	cytochrome P450
		D	LOC_Os04g40460	---	Chr4: 24043880-24047054	cytochrome P450
		I	LOC_Os01g70320	---	Chr1:40723385..40730507	---
درصد آب بافت گیاهچه Water percentage of seedling tissue	RM273	D	LOC_Os01g70310	---	Chr1:40714145..40717179	inducer of CBF expression 2
		U	LOC_Os04g40475	---	Chr4: 24052947-24054476	SELENIUM-BINDING PROTEIN
		I	LOC_Os04g40470	---	Chr4: 24049070-24051142	cytochrome P450
ضریب آلومتریک Allometric coefficient	RM315	U	LOC_Os01g63410	---	Chr1:36735951..36737401	---
		I	LOC_Os01g63400	---	Chr1:36732836..36737403	PPR repeat containing protein
		D	LOC_Os01g63393	---	Chr1:36730708..36731031	---
سرعت جوانه‌زنی Germination rate	RM510	U	LOC_Os06g06120	---	Chr6: 2,832,462-2,836,324	---
		I	---	---	---	---
	D	LOC_Os06g06115	---	Chr6: 2,828,443-2,830,314	---	
	RM273	U	LOC_Os04g40475	---	Chr4: 24052947-24054476	SELENIUM-BINDING PROTEIN
		I	LOC_Os04g40470	---	Chr4: 24049070-24051142	cytochrome P450
D	LOC_Os04g40460	---	Chr4: 24043880-24047054	cytochrome P450		

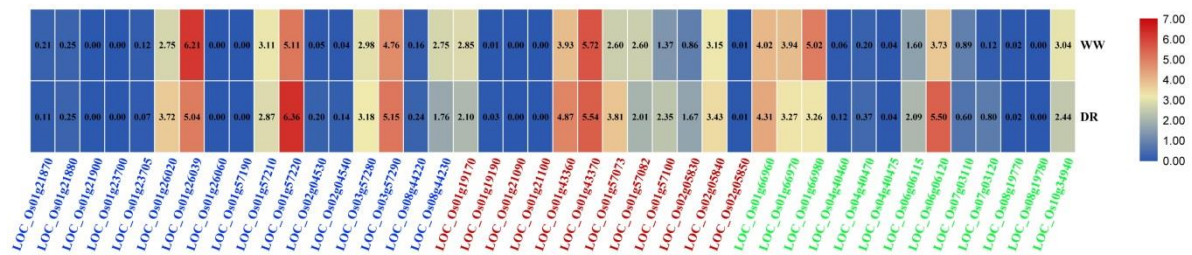
U: بالادست ژن؛ I: خود ژن؛ D: پایین دست ژن

U: Upstream; I: In frame; D: Downstream

نتایج آنالیز بیوانفورماتیک نشان داد که در شرایط بدون تنش هفده ژن اختصاصی، در شرایط تنش ۰/۳- مگاپاسکال دوازده ژن اختصاصی و در شرایط ۰/۶- مگاپاسکال سیزده ژن اختصاصی درگیر هستند. سایر ژن‌های شناسایی شده در هر سه شرایط تنش مشترک هستند. الگوی بیان ژن‌های اختصاصی شرایط کنترل، تیمار ۰/۳- مگاپاسکال و تیمار ۰/۶- مگاپاسکال در شرایط بدون تنش و تنش خشکی بر اساس داده‌های RNA-seq در شکل ۱ ارائه شده است. با توجه به شکل ۱ در بین مکان‌های ژنی اختصاصی شرایط بدون تنش با توجه به ایجاد تنش، بیان مکان‌های ژنی LOC_Os01g57220 از ۵/۱ به ۶/۳۵ و LOC_Os01g26020 از ۲/۷۵ به ۳/۷۲ افزایش و LOC_Os01g26039 از ۶/۲۱ به ۵/۲۴ کاهش یافته است. همچنین در بین مکان‌های ژنی اختصاصی شرایط تنش ۰/۳- مگاپاسکال با توجه به ایجاد تنش، بیان مکان‌های ژنی LOC_Os01g57100 از ۱/۳۷ به ۲/۳۵ و

نتایج آنالیز بیوانفورماتیک نشان داد که در شرایط بدون تنش هفده ژن اختصاصی، در شرایط تنش ۰/۳- مگاپاسکال دوازده ژن اختصاصی و در شرایط ۰/۶- مگاپاسکال سیزده ژن اختصاصی درگیر هستند. سایر ژن‌های شناسایی شده در هر سه شرایط تنش مشترک هستند. الگوی بیان ژن‌های اختصاصی شرایط کنترل، تیمار ۰/۳- مگاپاسکال و تیمار ۰/۶- مگاپاسکال در شرایط بدون تنش و تنش خشکی بر اساس داده‌های RNA-seq در شکل ۱ ارائه شده است. با توجه به شکل ۱ در بین مکان‌های ژنی اختصاصی شرایط بدون تنش با توجه به ایجاد تنش، بیان مکان‌های ژنی LOC_Os01g57220 از ۵/۱ به ۶/۳۵ و LOC_Os01g26020 از ۲/۷۵ به ۳/۷۲ افزایش و LOC_Os01g26039 از ۶/۲۱ به ۵/۲۴ کاهش یافته است. همچنین در بین مکان‌های ژنی اختصاصی شرایط تنش ۰/۳- مگاپاسکال با توجه به ایجاد تنش، بیان مکان‌های ژنی LOC_Os01g57100 از ۱/۳۷ به ۲/۳۵ و

نتایج آنالیز بیوانفورماتیک نشان داد که در شرایط بدون تنش هفده ژن اختصاصی، در شرایط تنش ۰/۳- مگاپاسکال دوازده ژن اختصاصی و در شرایط ۰/۶- مگاپاسکال سیزده ژن اختصاصی درگیر هستند. سایر ژن‌های شناسایی شده در هر سه شرایط تنش مشترک هستند. الگوی بیان ژن‌های اختصاصی شرایط کنترل، تیمار ۰/۳- مگاپاسکال و تیمار ۰/۶- مگاپاسکال در شرایط بدون تنش و تنش خشکی بر اساس داده‌های RNA-seq در شکل ۱ ارائه شده است. با توجه به شکل ۱ در بین مکان‌های ژنی اختصاصی شرایط بدون تنش با توجه به ایجاد تنش، بیان مکان‌های ژنی LOC_Os01g57220 از ۵/۱ به ۶/۳۵ و LOC_Os01g26020 از ۲/۷۵ به ۳/۷۲ افزایش و LOC_Os01g26039 از ۶/۲۱ به ۵/۲۴ کاهش یافته است. همچنین در بین مکان‌های ژنی اختصاصی شرایط تنش ۰/۳- مگاپاسکال با توجه به ایجاد تنش، بیان مکان‌های ژنی LOC_Os01g57100 از ۱/۳۷ به ۲/۳۵ و



شکل ۱- الگوی بیانی ژن‌های اختصاصی شناسایی شده برای شرایط بدون تنش و تنش اسمزی

Figure 1. Expression pattern of specific genes identified for normal conditions and salinity stress داده‌های بیانی به صورت $\log_2(\text{FPKM}+1)$ در شرایط بدون تنش (WW) و تنش خشکی (DR) ارائه شده‌اند. میزان بیان از صفر تا ۷ بر اساس شاخص رنگی ارائه شده است.

Expression data is presented as $\log_2(\text{FPKM} + 1)$ in irrigation (WW) and drought (DR) stress conditions. Expression rates range from zero to 7 based on the color index.

کاتالیزوری تبدیل فیتول به فیتول استر را برای جلوگیری از تخریب کلروفیل دارد (Zhang *et al.*, 2018). وجود ژن‌های اختصاصی با الگوی بیان و کارکرد متنوع در شرایط بدون تنش و تنش حاکی از پیچیدگی پاسخ برنج به خشکی می‌باشد. بررسی کارکرد این ژن‌ها که بر اساس نشانگرهای معنی‌دار در این مطالعه شناسایی شده‌اند می‌تواند برای اهداف به‌نژادی برنج مورد توجه قرار گیرند. همچنین به‌نظر می‌رسد بررسی دقیق‌تر بیان مکان‌های ژنی LOC_Os01g57220 و LOC_Os01g26039 که بر اساس داده‌های RNA-seq به‌ترتیب بیشترین بیان در شرایط نرمال و تنش اسمزی را دارند، با استفاده از تکنیک qRT-PCR بتواند اطلاعات مفیدی را در این راستا فراهم آورد.

در پژوهشی که بر روی رگه‌های خالص خویش‌آمیخته نوترکیب برنج حاصل از تلاقی IR29 × Pokkali در خصوص تحمل به شوری انجام شد، مکان‌ژنی LOC_Os01g26020 در QTL بزرگ اثر *Saltol* شناسایی شده است (Kim *et al.*, 2009). همچنین در بررسی دیگری بر روی ژنوم برنج و آرآیدوپسیس، مشخص شد مکان‌ژنی LOC_Os01g57100 یک کیناز شبه گیرنده لکتین (Lectin receptor-like kinase) بوده و بیان آن در پاسخ به تنش‌ها و نیز نمو برنج افزایش می‌یابد (Vaid *et al.*, 2012). در بررسی‌های انجام شده بر روی مکان‌ژنی LOC_Os01g66980 در گیاه برنج مشخص شد این ژن عامل محرک اتصال ریبوزوم می‌باشد (Blasi *et al.*, 2017) و مکان‌ژنی LOC_Os01g26039 نیز مسئولیت

References

- Abdul-Baki, A.A. and Anderson, J.D. (1973). Vigor determination in soybean seed by multiple criteria. *Crop Science*, **13**: 630-633.
- Agrawal, R. (1980). *Seed Technology*. Pub. Co. PVT. LTD. New Dehli, IND.
- Blasi, É.A., Buffon, G., Rativa, A.G., Lopes, M.C., Berger, M., Santid, L., Lavallée-Adame, M., Yates, J., Schwambach, J., Beys-da-Silvad, W. and Sperottoa, R. (2017). High infestation levels of *Schizotetranychus oryzae* severely affects rice metabolism. *Journal of Plant Physiology*, **219**: 100-111.
- Bolser, D., Staines, D.M., Pritchard, E. and Kersey, P. (2016). *Ensembl Plants: Integrating Tools for Visualizing, Mining, and Analyzing Plant Genomics Data*. Plant Bioinformatics. Humana Press, New York, USA.
- Camberato, J., and Mccarty, B. (1999). Irrigation water quality: part I. salinity. *South Carolina Turfgrass Foundation New*, **6(2)**: 6-8.
- Chen, C., Chen, H., He, Y. and Xia, R. (2018). TBtools, a toolkit for biologists integrating various biological data handling tools with a user-friendly interface, *BioRxiv*.**1**: 289660.
- Collard, B.C., Beredo, J.C., Lenaerts, B., Mendoza, R., Santelices, R., Lopena, V., Verdeprado, H., Raghavan, C., Gregorio, G.B., Vial, L. and Demont, M. (2017). Revisiting rice breeding methods–

- evaluating the use of rapid generation advance (RGA) for routine rice breeding. *Plant Production Science*, **20(4)**: 337-352.
- Djanaguiraman, M., Senthil, A. and Ramadass, R.** (2004). Mechanism of salt tolerance in rice genotypes during germination and seedling growth. *Indian Journal of Agricultural Research*, **38(1)**: 73-76.
- Edwards, J.D., Baldo, A.M. and Mueller, L.A.** (2016). Ricebase: a breeding and genetics platform for rice, integrating individual molecular markers, pedigrees and whole-genome-based data. *Database*, **107**: 1- 6.
- Fazeli Kakhki, F., Nazemi, A., Parsa, M. and Kafi, M.** (2015). Evaluation of germination indices and seedling growth in sesame ecotypes (*Sesamum indicum* L.) under salinity conditions. *Environmental Stress in Crop Science*, **7(2)**: 217-232 (In Persian).
- Hussain, F.** (1989). *Field and Laboratory Manual of Plant Ecology*. National Academy of Higher Education. University Grants Commission, Islamabad, PK.
- IBM Corp.** (2016). *IBM SPSS Statistics for Windows*, Version 24.0. Armonk, IBM, New York, USA.
- Jafarzadeh-Razmi, M., Navabpour, S., Sabouri, H. and Ramzanpour, S.S.** (2020). qGW, a stable and major QTL for increasing of grain weight in rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Genetic Researches*, **6(2)**: 173-182 (In Persian).
- Kavousi, M.** (2001). *Study of Interaction Effects Between Different Levels of Nitrogen and Potassium on Rice Yield*. Rice Research Institute of Iran. Research Report, Rasht, IR (In Persian).
- Kawahara, Y., Bastide, M., Hamilton, J.P., Kanamori, H., McCombie, W.R., Ouyang, Sh., Schwartz, D.C., Tanaka, T., Wu, J., Zhou, Sh., Childs, K.L., Davidson, R.M., Lin, H., Quesada-Ocampo, L., Vaillancourt, B., Sakai, H., Lee, S.Sh., Kim, J., Numa, H., Itoh, T., Buell, C.R. and Matsumoto, T.** (2013). Improvement of the (*Oryza sativa* L.) Nipponbare reference genome using next generation sequence and optical map data. *Rice*, **6(1)**: 4.
- Kim, S. H., Bhat, P. R., Cui, X., Walia, H., Xu, J., Wanamaker, S., Ismai, A. M., Wilson, C. and Close, T.J.** (2009). Detection and validation of single feature polymorphisms using RNA expression data from a rice genome array. *BMC Plant Biology*, **9(1)**: 65.
- Michel, B.E. and Kaufman, M.R.** (1973). The osmotic potential of polyethylene glycol 6000. *Plant Physiology*, **51**: 914-916.
- Millan, T., Clarke, H.J., Siddique, K.H., Buhariwalla, H.K., Gaur, P.M., Kumar, J., Jagdish, K., Gil, J., Kahland G. and Winter, P.** (2006). Chickpea molecular breeding: new tools and concepts. *Euphytica*, **147(1-2)**: 81-103.
- Mirarab-Razi, S.M., Shirzadian-Khorramabad, R., Sabouri, H., Rabiei, B. and Hosseini Moghadam, H.** (2019). Response of Iranian Rice Recombinant Inbred Lines (*Oryza sativa* L.) to Salt Stress in Seedling Stage. *Journal of Crop Breeding*, **11(29)**: 65-84.
- Mohammadi, M., Xavier, A., Beckett, T., Beyer, S., Chen, L., Chikssa, H., Cross, V., Moreira, F.F., French, E., Gaire, R. and Griebel, S.** (2020). Identification, deployment, and transferability of quantitative trait loci from genome-wide association studies in plants. *Current Plant Biology*, **24**: 100145.
- Monaco, M.K., Stein, J., Naithani, S., Wei, Sh., Dharmawardhana, P., Kumari, S., Amarasinghe, V., Youens-Clark, K., Thomason, J., Preece, J., Pasternak, S.h., Olson, A., Jiao, Y., Lu, Z.h., Bolser, D., Kerhornou, A., Staines, D., Walts, B., Wu, G., Eustachio, P.D., Haw, R., Croft, D., Kersey, P.J., Stein, L., Jaiswal, P. and Ware, D.** (2013) Comparative plant genomics resources. *Nucleic Acids Research*, **42**:1193-1199.
- Nasiri, E., Sabouri, A., Forghani. and Esfahani, M.** (2018). Grouping of rice genotypes based on grain iron, zinc, manganese and protein and performance measurement of linked microsatellite markers. *Plant Genetic Researches*, **5(2)**: 73-84.
- Rabiei, B. and Sabouri, H.** (2008). *Mapping of Genes Controlling Quantitative Traits*. Guilan University Press, Rasht, IR (In Persian).
- Sabouri, A., Dadras, A.R., Khoshchereh, H., Vatanparast, A. and Afitooni, H.** (2019). Investigation of rice recombinant inbred lines based on drought tolerance using tolerance indices and SSR marker. *Iranian Journal of Field Crop Science*, **49(4)**: 13-24.
- Sabouri, A., Afshari, R., Raiesi, T., Raouf, H.B., Nasiri, E., Esfahani, M., Kafi-Ghasemi, A. and Kumar, A.** (2018). Superior adaptation of aerobic rice under drought stress in Iran and validation test of linked SSR markers to major QTLs by MLM analysis across two years. *Molecular Biology Reports*, **45(5)**: 1037-1053.
- Sabouri, H., Rezai, A., Moumeni, A. and 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. and Porro, A., Eds., *Proceedings of the 4th International Temperate Rice Conference*, Tipografia Fiordo, Novara, , Italy

- Sabouri, H., Biabani, A., Sabouri, A. and Mohammad-Esmaili, M.** (2010). The study of QTLs related to seed vigour under stress caused to Sorbitol in rice. *Journal of Plant Production Research*, **17(2)**: 123-136 (In Persian).
- Saghai-Marooif, M.A., Biyashev, R.M., Yang, G.P., Zhang, Q. and Allard, R.W.** (1994). Extraordinarily polymorphic microsatellite DNA in barley: species diversity, chromosomal locations, and population dynamics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **91(12)**: 5466-5570.
- Segal, R. and Le Nguyet, M.** (2019). *Unfair Harvest: The State of Rice in Asia*. Oxford, UK.
- Singh, R.K., Gregorio, G.B. and Jain, R.K.** (2007). QTL mapping for salinity tolerance in rice. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, **13(2)**: 87-99.
- Solis, J., Gutierrez, A., Mangu, V., Sanchez, E., Bedre, R., Linscombe, S. and Baisakh, N.** (2018). Genetic mapping of quantitative trait loci for grain yield under drought in rice under controlled greenhouse conditions. *Frontiers in Chemistry*, **5**: 129.
- Soltani, A. and Maddah, V.** (2010). *Simple, Applied Programs for Education and Research in Agronomy*, Niak Press, Tehran, IR (In Persian).
- Srividhya, A., Ramanarao, P.V., Sridhar, S., Jayaprada, M., Anuradha, G., Srilakshmi, B., Reddy, H.K., Hariprasad, A.S., Siddiq, E.A. and Vemireddy, L.R.** (2011). Molecular mapping of QTLs for drought related traits at seedling stage under PEG induced stress conditions in rice. *American Journal of Plant Sciences*, **2(02)**: 190.
- Swamy, B.M., Vikram, P., Dixit, S., Ahmed, H.U. and Kumar, A.** (2011). Meta-analysis of grain yield QTL identified during agricultural drought in grasses showed consensus. *BMC Genomics*, **12(1)**: 319.
- Thomson, M., De-Ocampo, M., Egdane, J., Katimbang, M., Akhlasur-Rahman, M., Singh, R. K., Gregorio, G.B. and Ismail M.A.** (2007). QTL mapping and marker-assisted backcrossing for improved salinity tolerance in rice, *The 6th Asian Crop Science Association Conference and 2th International Conference on Rice for the Future*, 5-9 November, Bangkok, Thailand.
- Tsonev, T.D., Lazova, G.N., Stoinova, Z.G. and Popova, L.P.** (1998). A possible role for jasmonic acid in adaptation of barley seedling to salinity stress. *Journal of Plant Growth Regulation*, **17(3)**: 153-159.
- Tuberosa, R., Gill, B.S. and Quarrie, S.A.** (2002). Cereal genomics: ushering in a brave new world. *Plant Molecular Biology*, **48(5-6)**: 445-449.
- Tuyen, D.D. and Prasad, D.T.** (2008). Evaluating difference of yield trait among rice genotypes (*Oryza sativa* L.) under low moisture condition using candidate gene markers. *Omonrice*, **16**: 24-33.
- Vaid, N., Pandey, P.K. and Tuteja, N.** (2012). Genome-wide analysis of lectin receptor-like kinase family from Arabidopsis and rice. *Plant Molecular Biology*, **80(4-5)**: 365-388.
- Verma, S.K., Saxena, R.R., Saxena, R.R., Xalxo, M.S. and Verulkar, S.B.** (2014). QTL for grain yield under water stress and non-stress conditions over years in rice (*Oryza sativa* L.). *Australian Journal of Crop Science*, **8(6)**: 916-926.
- Vikram, P., Swamy, B.M., Dixit, S., Ahmed, H.U., Cruz, M.T.S., Singh, A.K. and Kumar, A.** (2011). qDTY 1.1, a major QTL for rice grain yield under reproductive-stage drought stress with a consistent effect in multiple elite genetic backgrounds. *BMC Genetics*, **12(1)**: 89.
- Wang, Z., Wang, J., Bao, Y., Wu, Y. and Zhang, H.** (2011). Quantitative trait loci controlling rice seed germination under salt stress. *Euphytica*, **178(3)**: 297-307.
- Wenhui, W.A.N.G., Linlin, W.A.N.G., Yujun, Z.H.U., Yeyang, F.A.N. and Jieyun, Z.H.U.A.N. G.** (2019). Fine-mapping of qTGW1. 2a, a quantitative trait locus for 1000-grain weight in rice. *Rice Science*, **26(4)**: 220-228.
- Willenborg, C.J., Wildeman, J.C., Miller, A.K., Rosnagel, B.G. and Shirliffe, S.J.** (2005). Oat germination characteristics differ among genotypes, seed sizes, and osmotic potentials. *Crop Science*, **45(5)**: 2023-2029.
- Xia, L., Zou, D., Sang, J., Xu, X., Yin, H., Li, M., Wu, S., Hu, S., Hao, L. and Zhang, Z.** (2017). Rice expression database (RED): an integrated RNA-Seq-derived gene expression database for rice. *Journal of Genetics and Genomics*, **44(5)**: 235-41.
- Zhang, J., Jia, W., Yang, J. and Ismail, A.M.** (2006). Role of ABA in integrating plant responses to drought and salt stresses. *Journal of Field Crops Research*, **97**: 111-119.
- Zhang, J., Li, Y., Guo, J., Du, B., He, G., Zhang, Y., Chen, R. and Li, J.** (2018). Lipid profiles reveal different responses to brown planthopper infestation for pest susceptible and resistant rice plants. *Metabolomics*, **14(9)**: 120.
- Zheng, M., Tao, Y., Hussain, S., Jiang, Q., Peng, S., Huang, J., Cui, K. and Nie, L.** (2016). Seed priming in dry direct-seeded rice: consequences for emergence, seedling growth and associated metabolic events under drought stress. *Plant Growth Regulation*, **78(2)**: 167-178.

Identification of Genes and Molecular Markers Associated with Germination Components in F₉ Lines of Rice under Osmotic Stress

Abbas Saberi Kuchesfahani¹, Atefeh Sabouri^{2,*}, Amin Abedi³, Ali Aalami⁴
and Teimour Razavipour⁵

- 1- M.Sc. Student, 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- Former Ph.D. Student, Department of Biotechnology, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran
- 4- Associate Professor, Department of Biotechnology, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran
- 5- Assistant Professor, Rice Research Institute of Iran, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Rasht, Iran

(Received: July 25, 2020 – Accepted: September 14, 2020)

Abstract

Since rice needs more water to grow than other cereals, therefore it would be more vulnerable to water stress and, in this regard, it is necessary to improve rice cultivars to tolerance to environmental stresses. In this research 154 recombinant inbred lines (F₉) derived from a cross between Shah-Pasand and IR28 in three conditions (non-stress, osmotic stress -0.3 and -0.6 Mpa induced through polyethylene glycol-6000) were evaluated as a factorial experiment in randomized complete block design. In addition, for molecular polymorphism experiment, 110 SSR and EST-SSR markers were assessed on parents of population and among them, 41 markers identified which had proper polymorphism between two parents. The regression analysis between germination components and molecular markers revealed the most coefficient of determination were found in RM211 for allometric coefficient (17%) under non-stress, RMES10-1 for Plumule dry weight (18%) under -0.3 MPa; and RM273 for germination uniformity (22.7%) under -0.6 MPa. RM3496, RM452, and RMES6-1 in three conditions had the most number of significant relationships with six, three and eight traits, respectively, and they can be a suitable candidate for simultaneous improvement of several traits in breeding programs of marker-assisted selection. In addition, after the identification of significant markers associated with germination components, the closest genes to these markers were identified using bioinformatic analysis, and the analysis of their expression were performed by rice transcriptome database. According to the results, the maximum gene expression pattern under drought stress and under non-stress conditions were related to loci LOC_Os01g57220 and LOC_Os01g26039, respectively and this information could be applied in breeding programs.

Keywords: Marker assisted selection, Environmental stress, Microsatellite markers

* Corresponding Author, E-mail: a.sabouri@guilan.ac.ir