

Identification of microsatellite markers linked to grain discoloration disease in rice genotypes

Somayeh Dariush 

Ph.D. Student, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Khorramabad, Iran. Email: dariush_rona@yahoo.com. ORCID ID: 0000-0002-7374-9405.

Mostafa Darvishnia 

*Associate Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Khorramabad, Iran. Tel: +98-9166616300. Email: mdarvishnia44@yahoo.com and Darvishnia.m@lu.ac.ir. ORCID ID: 0000-0002-5860-1330.

Ali-Akbar Ebadi 

Assistant Professor, Department of Seed Improvement, Rice Research Institute of Iran (RRII), Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Rasht, Iran. Email: ebady_al@yahoo.com. ORCID ID: 0000-0003-1344-5810.

Fereidoun Padasht-Dehkaei 

Associate Professor, Department of Plant Protection, Rice Research Institute of Iran (RRII), Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Rasht, Iran. Email: padashtf@yahoo.com. ORCID ID: 0000-0001-5175-3529.

Eidi Bazgir 

Assistant Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Khorramabad, Iran. Email: bazgire14@gmail.com. ORCID ID: 0000-0002-0797-5527.

Abstract

Objective

Rice grain discoloration disease is emerging as a major threat in improved and late ripening varieties in the north of Iran that deteriorates grain quality and physical

properties. Breeding for disease resistance is the preferred strategy to manage grain discoloration. An important application of molecular markers in plant systems involves improvement in the efficiency of conventional plant breeding by carrying out indirect selection through molecular markers linked to the traits of interest. In this context, association analysis was used to identify molecular markers associated with grain discoloration resistance in rice genotypes in this study.

Materials and Methods

In this study, resistance of 94 rice genotypes (Iranian landrace and improved varieties and exotic genotypes) to grain discoloration disease was evaluated during 2017 and 2018. Genotyping was done using 128 pairs of polymorphic microsatellite markers on 94 genotypes of rice. Then association analysis was conducted through general linear model (GLM) and mixed linear model (MLM) by using TASSEL software.

Results

Phenotypic analysis showed that there is high diversity in the studied genotypes for resistance to grain discoloration disease. The model-based structure analysis classified rice genotypes into two sub-populations. In association analysis based on GLM and MLM models, 12 and 3 QTLs showed significant relations after considering Bonferroni correction with grain discoloration in two years, respectively.

Conclusion

Both GLM and MLM detected 3 markers (RM242, RM5709 and RM5955) associated with grain discoloration resistance in both 2017 and 2018, suggesting that these markers can be used in rice breeding programs like marker-assisted selection (MAS).

Keywords: Association mapping, Disease resistance, Grain discoloration, Molecular marker, Rice

Citation: Dariush S, Darvishnia M, Ebadi AA, Padasht-Dehkaei F, Bazgir E (2020) Identification of microsatellite markers linked to grain discoloration disease in rice genotypes. *Agriculture Biotechnology Journal* 12 (2), 157-182.

Agricultural Biotechnology Journal 12 (2), 157-182.

DOI: 10.22103/jab.2020.15160.1190

Received: May 4, 2020; Accepted: June 17, 2020.

© Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant Production, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian Biotechnology Society

شناسایی نشانگرهای ریزماهوره پیوسته با مقاومت به بیماری تغییر رنگ دانه در

ژنوتیپ‌های برنج

سمیه داریوش

دانشجوی دکتری گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، ایران. ایمیل: dariush_rona@yahoo.com. کد ORCID: ۰۰۰۲-۰۰۰۰-۷۳۷۴-۹۴۰۵.

مصطفی درویش‌نیا

*نویسنده مسئول دانشیار گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، ایران. تلفن: ۰۹۱۶۶۶۱۶۳۰۰. ایمیل: mdarvishnia44@yahoo.com و Darvishnia.m@lu.ac.ir. کد ORCID: ۰۰۰۲-۰۰۰۰-۵۸۶۰-۱۳۳۰.

علی‌اکبر عبادی

استادیار بخش اصلاح و تهیه بذر، مؤسسه تحقیقات برنج کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی ایران، رشت، ایران. ایمیل: ebady_al@yahoo.com. کد ORCID: ۰۰۰۳-۰۰۰۰-۱۳۴۴-۵۸۱۰.

فریدون پاداشت‌دهکایی

دانشیار بخش گیاهپزشکی، مؤسسه تحقیقات برنج کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی ایران، رشت، ایران. ایمیل: padashtf@yahoo.com. کد ORCID: ۰۰۰۱-۰۰۰۰-۵۱۷۵-۳۵۲۹.

عیدی بازگیر

استادیار گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، ایران. ایمیل: bazgire14@gmail.com. کد ORCID: ۰۰۰۲-۰۰۰۰-۰۷۹۷-۵۵۲۷.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۲/۱۵، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۳/۲۸

چکیده

هدف: بیماری تغییر رنگ دانه برنج به عنوان تهدید جدی بر عملکرد دانه و کیفیت آن در ارقام دیررس و به‌نژادی شده در نواحی برنج‌کاری شمال ایران محسوب شده که موجب ایجاد خسارت در کیفیت و خصوصیات فیزیکی بذر می‌گردد. بدین جهت به‌نژادی ژنوتیپ‌های برنج برای صفت مقاومت به بیماری، از استراتژی‌های ترجیحی در مدیریت بیماری تغییر رنگ دانه در برنج محسوب می‌شود. یکی از مهمترین کاربردهای نشانگرهای مولکولی در برنامه‌های به‌نژادی گیاهان، نقش آن‌ها در افزایش کارایی به‌نژادی

سنّتی گیاهان از طریق انتخاب غیرمستقیم با کاربرد نشانگرهای پیوسته با صفات هدف می‌باشد. از این‌رو، در این پژوهش، از تجزیه ارتباطی برای شناسایی نشانگرهای پیوسته مرتبط با صفت مقاومت به بیماری تغییر رنگ دانه در ژنوتیپ‌های برنج استفاده شد.

مواد و روش‌ها: در پژوهش حاضر، جهت ارزیابی فنوتیپی مقاومت ۹۴ ژنوتیپ برنج شامل ارقام محلی و به‌نژادی شده ایرانی و وارداتی به بیماری تغییر رنگ دانه طی دو سال زراعی ۱۳۹۶ و ۱۳۹۷ مورد بررسی قرار گرفت. ارزیابی ژنوتیپی با استفاده از ۱۲۸ نشانگر چندشکل ریزماهواره روی ۹۴ ژنوتیپ برنج اجرا شد. سپس تجزیه ارتباطی از طریق مدل خطی عمومی (GLM) و مدل خطی مخلوط (MLM)، با استفاده از نرم‌افزار TASSEL انجام شد.

نتایج: نتایج ارزیابی فنوتیپی نشان داد که تنوع بالایی در ژنوتیپ‌های مورد مطالعه برای مقاومت به بیماری تغییر رنگ دانه وجود دارد. بر اساس تجزیه ساختار مبتنی بر مدل، ژنوتیپ‌های برنج مورد بررسی در دو زیرجمعیت کلاستر بندی شدند. در تجزیه ارتباطی به دو روش GLM و MLM، بعد از تصحیح بنفرونی به ترتیب، ۱۲ و ۳ نشانگر ارتباط معنی‌داری را با صفت مقاومت به بیماری تغییر رنگ دانه در هر دو سال نشان دادند.

نتیجه‌گیری: نشانگرهای RM242، RM5709 و RM5955 در دو مدل آماری GLM و MLM ارتباط معنی‌داری با مقاومت به بیماری تغییر رنگ دانه در دو سال ۱۳۹۶ و ۱۳۹۷ نشان دادند. بنابراین می‌توان از آن‌ها به عنوان نشانگرهای پیوسته با صفت مقاومت در برنامه‌های به‌نژادی برنج نظیر انتخاب به کمک نشانگر استفاده نمود.

کلمات کلیدی: برنج، نقشه‌یابی ارتباطی، تغییر رنگ دانه، مقاومت به بیماری، نشانگرهای مولکولی

مقدمه

در سال‌های اخیر معرفی واریته‌ها با عملکرد بالا، تغییرات اقلیمی و تغییر در روش‌های مدیریت زراعی منجر به افزایش شدت خسارت تعدادی از بیماری‌های کم‌اهمیت از نظر اقتصادی در برنج شده است، که می‌توان به بیماری تغییر رنگ دانه برنج اشاره کرد. تغییر رنگ دانه برنج یک بیماری کمپلکس است که توسط طیف وسیعی از قارچ‌ها و باکتری‌های بیماریزا روی پوسته، دانه و یا هر دو ایجاد می‌شود و از اغلب نواحی برنج‌کاری جهان گزارش شده است. علائم بیماری شامل ایجاد لکه‌های سیاه و قهوه‌ای می‌باشد، که دامنه شدت آن از تغییر رنگ پراکنده در سطح پوست تا تغییر رنگ کامل بذر متغیر است (Mew and Gonzales, 2002; Ashfaq et al. 2017). بارندگی سنگین، مکرر و وقوع سیلاب به ویژه نزدیک به فصل برداشت، خوشه‌ها را مستعد آلودگی به انواعی از گونه‌های قارچی مستقر در کانوپی گیاه می‌سازد (Pandey et al. 2000; Prabhu et al. 2012). همچنین، گزارش‌هایی مبتنی بر افزایش شدت وقوع تغییر رنگ دانه در مزارع دیرکاشت و مزارع دچار کمبود عناصر غذایی چون نیتروژن، پتاسیم، آهن، منگنز و منیزیم وجود دارد (Misra et al. 1990; Prabhu et al. 2012). خسارت ناشی از بیماری تغییر رنگ دانه نه تنها به صورت کمی (کاهش وزن، طول، ضخامت، سطح و حجم دانه و جوانه‌زنی ضعیف بذور آلوده)

است بلکه به صورت کاهش کیفیت غذایی و ارزش بازاریابی محصول نیز دیده می‌شود. همچنین، درصد گچی بودن و خرد شدن دانه‌های تغییر رنگ یافته طی مرحله پوست‌کنی و سفید کردن برنج افزایش می‌یابد که در نهایت موجب کاهش راندمان تبدیل برنج خواهد شد (Marchetti and Petersen 1984; Dallagnol et al. 2014; Mobasher-Amini et al. 2015).

در ایران بیماری تغییر دانه و سوختگی خوشه با کشت ارقام به‌نژادی شده و پرمحصول در چند سال اخیر شیوع بالاتری در مزارع برنج شمال کشور داشته که به عنوان تهدید جدی برای تولید برنج در ایران به شمار می‌رود. شدت این بیماری همچنین در ارقام دیررس و در کشت‌های با تأخیر بیشتر است. گونه‌های قارچی *Fusarium fujikuroi*، *Bipolaris oryzae*، *Fusarium graminearum*، *Culvularia sp.* و *Alternaria sp.* و گونه‌های باکتریایی *Pseudomonas acidovorax avenae subsp. avenae* و *Pseudomonas ananas*، *Pseudomonas syringae*، *fuscovaginae* به عنوان عوامل تغییر رنگ دانه و خوشه در استان‌های گیلان و مازندران معرفی شده‌اند (Rostami et al. 2013; Padasht-Dehkaei 2015). به طور معمول استراتژی‌های در دسترس برای مدیریت بیماری تغییر رنگ دانه کاربرد قارچکش در مرحله ظهور خوشه، کوددهی مناسب، کاشت به‌موقع و زودهنگام و کاربرد ژرم‌پلاسماهای مقاوم می‌باشد (Misra et al. 1990; Prabhu et al. 2012). به دلیل هم‌زمانی تشدید شدت بیماری با بارندگی‌های پی‌درپی در مرحله خوشه‌دهی، کاربرد قارچکش برای کاهش بیماری خیلی کارآمد نخواهد بود، همچنین ادامه مصرف قارچکش منجر به توسعه مقاومت در بیمارگر می‌گردد که کارایی قارچکش را در کنترل بیماری کاهش می‌دهد (Kardin and Percich 1983; Prabhu et al. 2012). از این‌رو استفاده از ژنوتیپ‌های مقاوم، به عنوان روشی اثربخش، ایمن و اقتصادی برای کنترل بیماری محسوب می‌شود، که نقش کلیدی در تولید پایدار برنج ایفا می‌کند (Leung et al. 2003). با وجود اینکه به‌نژادی برای مقاومت به بیماری تغییر رنگ دانه روشی اقتصادی برای مدیریت این بیماری است، اما به دلیل وقوع بیماری توسط بیمارگرهای مختلف و افزایش شدت بیماری طی مرحله خوشه‌دهی هم‌زمان با بارش‌های متوالی، از کارایی این روش کاسته شده است (Prabhu et al. 2012). استفاده از نشانگرهای مولکولی در سال‌های اخیر جهت تعیین تنوع ژنتیکی بین جمعیت‌ها و جانداران حفاظت‌شده، کاربرد گسترده‌ای یافته است. میزان چندشکلی به‌دست آمده از این نشانگرهای ژنتیکی، یکی از پارامترهای قابل ارزیابی برای مطالعه جمعیت‌های مختلف و درک تفاوت‌های ژنتیکی بین جمعیت‌هاست (Vajed Ebrahimi et al. 2016). در این میان، ریزماهورها به سبب برتری‌هایی که دارند، برای مطالعات ژنتیک جمعیت نسبت به سایر نشانگرها ارجح هستند (Vajed Ebrahimi et al. 2017). انجمن‌های بین‌المللی ریزماهورها را به عنوان بهترین نشانگر جهت تعیین تنوع ژنتیکی گونه‌ها معرفی کرده است (Mohammadifar and Mohammadabadi 2011). همچنین، ارزیابی تنوع ژنتیکی از طریق نشانگرهای DNA و شناسایی نشانگرهای پیوسته با ژن یا صفت مورد نظر امکان کاربرد انتخاب به کمک نشانگر را برای به‌نژادگران در برنامه‌های به‌نژادی فراهم آورده است. انتخاب به کمک نشانگر منجر به کاهش زمان و هزینه در اجرای برنامه‌های به‌نژادی توسط به‌نژادگران می‌گردد (Ashkani et al. 2015). برای مکان‌یابی جایگاه‌های کنترل کننده صفات کمی از دو روش نقشه‌یابی پیوستگی و نقشه‌یابی ارتباطی استفاده می‌شود.

نقشه‌یابی ارتباطی به دلیل بهره‌گیری از تنوع موجود در جمعیت طبیعی در مقایسه با نقشه‌یابی پیوستگی، سه مزیت مهم دارد که شامل افزایش وضوح نقشه‌یابی، ظرفیت بالاتر برای شناسایی آل‌های بیشتر و کاهش زمان و هزینه برای اجرای نقشه‌یابی ژن هدف به دلیل عدم نیاز به جمعیت‌های نقشه‌یابی دو-والدی می‌شود (Yu and Buckler 2006; Zhu et al. 2008). مطالعات اندکی در زمینه شناسایی مکان ژنومی صفت مقاومت به بیماری تغییر رنگ خوشه انجام شده است. مطالعات اخیر نشان می‌دهد که مقاومت به بیماری تغییر رنگ خوشه و پوسیدگی دانه با عامل باکتریایی *Burkholderia glumae* یک صفت کمی است که توسط تعداد زیادی ژن کنترل می‌شود (Pinson et al. 2010). با توجه به اینکه بیماری تغییر رنگ دانه در شمال ایران در برخی از ژنوتیپ‌های به‌نژادی شده با والد خارجی خسارت‌زا و حائز اهمیت می‌باشد (Padasht-Dehkaei 2015)، بنابراین شناسایی نشانگرهای مرتبط با صفت مقاومت به تغییر رنگ دانه برای شناسایی ارقام مقاوم در مراحل اولیه برای انتخاب والدین مناسب جهت معرفی ارقام جدید در برنامه‌های به‌نژادی ضروری به نظر می‌رسد. به همین دلیل هدف این پژوهش شناسایی مکان‌های ژنومی مرتبط با صفت مقاومت به بیماری تغییر رنگ دانه و معرفی نشانگرهای ریزماهواره پیوسته با این صفت با استفاده از تجزیه ارتباطی برای تسریع و کارایی بیشتر روش‌های سنتی به‌نژادی ژنوتیپ‌های برنج بود.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و ارزیابی فنوتیپی: در این مطالعه واکنش ۹۴ ژنوتیپ برنج شامل ۴۱ رقم محلی ایرانی، ۲۹ رقم به‌نژادی شده ایرانی و ۲۴ ژنوتیپ وارداتی به بیماری تغییر رنگ دانه در دو سال زراعی ۱۳۹۶ و ۱۳۹۷ مورد بررسی قرار گرفت (جدول ۱). نشاکاری در مرحله ۴-۵ برگی به تعداد ۳ نشا در هر کپه به فواصل ۲۰×۲۰ سانتی‌متر در مزرعه تحقیقاتی مؤسسه تحقیقات برنج کشور واقع در رشت در قالب طرح بلوک کامل تصادفی با سه تکرار و برای هر تکرار ۴ خط به طول ۱ متر صورت گرفت. جهت ارزیابی بیماری تغییر رنگ دانه در ژنوتیپ‌های مورد بررسی، یک هفته قبل از برداشت، ۱۰ خوشه از هر تکرار به طور تصادفی نمونه‌برداری و جهت تعیین شدت بیماری، ۱۰۰ عدد بذر از ۱۰ خوشه به طور تصادفی انتخاب شد و تعیین سطح تغییر رنگ دانه تحت آلودگی طبیعی بر اساس سیستم ارزیابی استاندارد مؤسسه تحقیقات بین‌المللی برنج با درجات ۰-۷ انجام شد (IRRI 2013). سپس درصد شاخص بیماری با استفاده از فرمول ارائه شده توسط McKinney (1923) محاسبه شد. تجزیه واریانس درصد شدت تغییر رنگ دانه در دو سال ۱۳۹۶ و ۱۳۹۷ به صورت جداگانه بر اساس طرح بلوک کامل تصادفی در نرم‌افزار SAS ver. 9.1 انجام شد و مقایسه میانگین از طریق روش توکی در سطح احتمال ۵ درصد صورت گرفت.

جدول ۱. ژنوتیپ‌های برنج مورد استفاده در این مطالعه همراه با منشأ و شجره آن‌ها

Table 1. List of rice genotypes used in this study along with their origin and pedigree

منشأ Origin	شجره Pedigree	ژنوتیپ Genotype	ردیف Number
گیلان، ایران Guilan,Iran	بومی Landrace	صدری Sadri	1
گیلان، ایران Guilan,Iran	بومی Landrace	دم‌سیاه Domsiyah	2
گیلان، ایران Guilan,Iran	بومی Landrace	دم‌سیاه سلیمان‌داراب Domsiyah-Soleiman-Darab	3
گیلان، ایران Guilan,Iran	بومی Landrace	حسن‌سرای Hasan saraei	4
گیلان، ایران Guilan,Iran	بومی Landrace	حسن‌سرای آت‌شگاه Hasan saraei-Atashgah	5
گیلان، ایران Guilan,Iran	بومی Landrace	حسن‌سرای پیچیده غلاف Hasan saraei-Pichide ghalaf	6
گیلان، ایران Guilan,Iran	بومی Landrace	بی‌نام Binam	7
گیلان، ایران Guilan,Iran	بومی Landrace	هاشمی Hashemi	8
گیلان، ایران Guilan,Iran	بومی Landrace	دم‌سفید Domsefid	9
گیلان، ایران Guilan,Iran	بومی Landrace	دم‌سرخ Domsorkh	10
گیلان، ایران Guilan,Iran	بومی Landrace	دم‌زرد Domzard	11
گیلان، ایران Guilan,Iran	بومی Landrace	غریب Gharib	12
گیلان، ایران Guilan,Iran	بومی Landrace	عنبربو Anbarbu	13
گیلان، ایران Guilan,Iran	بومی Landrace	علی‌کاظمی Ali-Kazemi	14
گیلان، ایران Guilan,Iran	بومی Landrace	حسنی Hasani	15
گیلان، ایران Guilan,Iran	بومی Landrace	سالاری Salari	16
گیلان، ایران Guilan,Iran	بومی Landrace	آبجی‌بوجی Abjibo-Ji	17
گیلان، ایران Guilan,Iran	بومی Landrace	رشتی‌سرد Rashti-Sard	18
گیلان، ایران Guilan,Iran	بومی Landrace	قصرالدشتی Ghasrodashti	19
گیلان، ایران Guilan,Iran	بومی Landrace	سنگ‌جو Sange-Jo	20
گیلان، ایران Guilan,Iran	بومی Landrace	قشنگه Ghashangeh	21

گیلان، ایران	بومی	چمپابودار	22
Guilan,Iran	Landrace	Champa-Budar	
گیلان، ایران	بومی	دشتی	23
Guilan,Iran	Landrace	Dashti	
گیلان، ایران	بومی	احمدجو	24
Guilan,Iran	Landrace	Ahmad-Jo	
گیلان، ایران	بومی	شاهپسند	25
Guilan,Iran	Landrace	Shahpasand	
گیلان، ایران	بومی	زیره	26
Guilan,Iran	Landrace	Zireh	
گیلان، ایران	بومی	زیره بندپی	27
Guilan,Iran	Landrace	Zireh-Bandpey	
مازندران، ایران	بومی	طارم محلی	28
Mazandaran, Iran	Landrace	Tarom-Mahalli	
مازندران، ایران	بومی	طارم امیری	29
Mazandaran, Iran	Landrace	Tarom-Amiri	
مازندران، ایران	بومی	طارم پاکوتاه	30
Mazandaran, Iran	Landrace	Tarom-Pakotah	
مازندران، ایران	بومی	طارم منطقه	31
Mazandaran, Iran	Landrace	Tarom-Mantaghe	
مازندران، ایران	بومی	سنگ طارم	32
Mazandaran, Iran	Landrace	Sange-Tarom	
مازندران، ایران	بومی	اهلمی طارم	33
Mazandaran, Iran	Landrace	Ahlami-Tarom	
مازندران، ایران	بومی	میرطارم	34
Mazandaran, Iran	Landrace	Mir-Traom	
مازندران، ایران	بومی	موسی طارم	35
Mazandaran, Iran	Landrace	Moosa-Tarom	
مازندران، ایران	بومی	دیلمانی	36
Mazandaran, Iran	Landrace	Deilamani	
مازندران، ایران	بومی	طارم جلودار	37
Mazandaran, Iran	Landrace	Tarom-Jolodar	
مازندران، ایران	بومی	محمدی چپرسر	38
Mazandaran, Iran	Landrace	Mohammadi-Chaparsar	
اصفهان، ایران	بومی	گرده	39
Esfahan, Iran	Landrace	Gerdeh	
خوزستان، ایران	بومی	هویزه	40
Khuzestan, Iran	Landrace	Hooveizeh	
خوزستان، ایران	بومی	عنبری	41
Khuzestan, Iran	Landrace	Anburi	
گیلان، ایران	TNAU7456/IR2071-625-1-52	خزر	42
Guilan,Iran		Khazar	
گیلان، ایران	آبجی بوجی/اصالح	گیلانه	43
Guilan,Iran	Abjibo-Ji/Saleh	Gilaneh	
گیلان، ایران	Pusa1238-1/pusa1238-81-6	گوهر	44
Guilan,Iran		Gohar	
گیلان، ایران	دم‌سیاه/IR 28/گرمه صدی	سپیدرود	45
Guilan,Iran	Domsiyah /IR28//Garme-Sadri	Sepidrud	

گیلان، ایران	سالاری/سپیدرود	درفک	46
Guilan,Iran	Salari/Sepidrud	Dorfak	
گیلان، ایران	دم‌سیاه/IR 28//IR 28	بجار	47
Guilan,Iran	Domsiyah /IR 28//IR 28	Bejar	
گیلان، ایران	خزر/IR39385-20-1-2-1-2	صالح	48
Guilan,Iran	Khazar/IR39385-20-1-2-1-2	Saleh	
گیلان، ایران	IR64669-153-23	کادوس	49
Guilan,Iran	IR64669-153-23	Kadus	
گیلان، ایران	موسی طارم/Ansitku	گیل ۱	50
Guilan,Iran	Moosa-Tarom/Ansitku	Gil 1	
گیلان، ایران	آمل ۳/سنگ طارم	نعمت	51
Guilan,Iran	Amol3/Sange-Tarom	Nemat	
گیلان، ایران	سنگ طارم/حسن‌سرایي//آمل ۳	ندا	52
Guilan,Iran	Sange-Tarom/Hasan saraei//Amol 3	Neda	
گیلان، ایران	آمل ۱/IR 24	دشت	53
Guilan,Iran	Amol 1/IR 24	Dasht	
مازندران، ایران	طارم فیروزکنده/1 Taichong Native	آمل ۱	54
Mazandaran, Iran	Tarom-Firozkandeh/Taichong Native 1	Amol 1	
مازندران، ایران	IR 28	آمل ۲	55
Mazandaran, Iran	IR 28	Amol 2	
مازندران، ایران	GEB24/TN1	آمل ۳	56
Mazandaran, Iran	GEB24/TN1	Amol 3	
مازندران، ایران	HSCSS	کوهسار	57
Mazandaran, Iran	HSCSS	Koohsar	
مازندران، ایران	IR62781-175-1-10	فجر	58
Mazandaran, Iran	IR62781-175-1-10	Fajr	
مازندران، ایران	IR66233-169-3-3	کشوری	59
Mazandaran, Iran	IR66233-169-3-3	keshvari	
مازندران، ایران	Basmati	ساحل	60
Mazandaran, Iran	Basmati	Sahel	
مازندران، ایران	خزر/دیلمانی	شیرودی	61
Mazandaran, Iran	Khazar/Deilamani	Shirudi	
مازندران، ایران	سنگ جو/سپیدرود/سنگ جو//سنگ جو	پردیس	62
Mazandaran, Iran	Sange-Jo/Sepidrud//Sange-Jo//Sange-Jo	Pardis	
مازندران، ایران	سنگ جو/سپیدرود/سنگ جو//سنگ جو	پژوهش	63
Mazandaran, Iran	Sange-Jo/Sepidrud//Sange-Jo//Sange-Jo	Pazhooresh	
مازندران، ایران	طارم محلی	تابش	64
Mazandaran, Iran	Tarom-Mahalli	Tabesh	
مازندران، ایران	IR67015-94-2-3	شفق	65
Mazandaran, Iran	IR67015-94-2-3	Shafagh	
مازندران، ایران	موسی طارم	مهر	66
Mazandaran, Iran	Moosa-Tarom	Mehr	
اصفهان، ایران	نوگران لنجان	زاینده‌رود	67
Esfahan, Iran	Nogran Lenjan	Zayandehrud	
اصفهان، ایران	نوگران لنجان	سازندگی	68
Esfahan, Iran	Nogran Lenjan	Sazandegi	
اصفهان، ایران	سنگ جو/سپیدرود/سنگ جو//سنگ جو	قائم	69
Esfahan, Iran	Sange-Jo/Sepidrud//Sange-Jo//Sange-Jo	Ghaem	
خوزستان، ایران		دانیال	70

Khuzestan, Iran	LD183	Danial	
فیلیپین	IR833-6-2-1-1/ IR1561-149-1//IR24*4/O.	IR 28	71
Philippines	<i>nivara</i>		
فیلیپین		IR 30	72
Philippines	IR1541-102-6-3/IR20*4/O. <i>nivara</i>		
فیلیپین		IR 36	73
Philippines	IR1561-228-1-2/IR1737 CR94-13		
فیلیپین		IR 50	74
Philippines	IR2153-14-1-6-2/IR 28 IR 36		
فیلیپین		IR 60	75
Philippines	IR4432-53-33/PTB33 IR 36		
فیلیپین		IR 64	76
Philippines	IR5657-33-2-1/ IR2061-465-1-5-5		
فیلیپین	رقم وارداتی	Line 120	77
Philippines	Introduction		
فیلیپین	رقم وارداتی	Line 213	78
Philippines	Introduction		
فیلیپین	رقم وارداتی	Line 338	79
Philippines	Introduction		
فیلیپین	رقم وارداتی	Line 830	80
Philippines	Introduction		
فیلیپین	رقم وارداتی	Line 833	81
Philippines	Introduction		
فیلیپین	رقم وارداتی	Line 834	82
Philippines	Introduction		
فیلیپین	رقم وارداتی	Line 835	83
Philippines	Introduction		
فیلیپین	رقم وارداتی	Line 839	84
Philippines	Introduction		
مصر	رقم وارداتی	Usen	85
Egypt	Introduction		
مصر	رقم وارداتی	Dcl	86
Egypt	Introduction		
مصر	رقم وارداتی	CY	87
Egypt	Introduction		
ژاپن		Norin 22	88
Japan	KINKI15/NORIN6		
ژاپن		Kanto 51	89
Japan	GIN BOZU/TO TO		
هند	وارداتی	NP 125	90
Indai	Introduction		
هند	وارداتی	KMP 41	91
India	Introduction		
آمریکا		Zenith	92
USA	AR, Blue Rose(Selection)		
ویتنام	بومی	Tetep	93
Vietnam	Landrace		
آمریکا	بومی	Dular	94
USA	Landrace		

ارزیابی ژنوتیپی/مولکولی: برای سنجش مولکولی، ابتدا استخراج DNA ژنومی از برگ‌های تازه و جوان ۳ بوته از هر ژنوتیپ به روش CTAB صورت گرفت (Murray and Thomson 1980). پس از استخراج DNA، کیفیت و کمیت تقریبی آن به وسیله ژل آگارز ۱ درصد تعیین شد. ارزیابی ژنوتیپی به کمک ۱۴۰ نشانگر ریزماهواره روی ۱۲ کروموزوم برنج اجرا شد. انتخاب نشانگرهای ریزماهواره بر اساس توزیع یکنواخت در سطح ژنوم، تولید باندها با وضوح بالا و همچنین با استفاده از پایگاه اطلاعات ژنتیکی گرامینه انجام گرفت (www.gramene.org). از تعداد ۱۴۰ نشانگر مورد بررسی روی ۹۴ ژنوتیپ برنج، ۱۲۸ نشانگر ریزماهواره چندشکلی قابل امتیازدهی نشان دادند. واکنش PCR در حجم نهایی ۱۰ میکرولیتر برای هر واکنش شامل ۲ میکرولیتر از DNA الگو با غلظت تقریبی ۵ نانوگرم، ۰/۶ میکرولیتر از آغازگرهای رو به جلو و رو به عقب با غلظت ۶۰ نانوگرم، ۰/۱۲ میکرولیتر مخلوط بازهای آلی dNTPs با غلظت نهایی ۱۰ میلی‌مولار، ۰/۱۲ میکرولیتر آنزیم Taq DNA Polymerase با غلظت نهایی ۵ واحد، ۰/۴۸ میکرولیتر $MgCl_2$ با غلظت ۵۰ میلی‌مولار و ۱ میکرولیتر بافر PCR با غلظت ۱۰ برابر انجام شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با استفاده از دستگاه Biometra مدل T-Gradient به روش Touch down جهت حذف نوارهای شبه‌ریزماهواره و جلوگیری از اتصال غیراختصاصی آغازگرها صورت گرفت. چرخه حرارتی شامل یک چرخه واسرشته‌سازی اولیه در ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه و به دنبال آن ۱۰ چرخه شامل ۴۵ ثانیه در ۹۴ درجه سلسیوس (جهت واسرشته‌سازی)، ۴۵ ثانیه در دمای ۱۰ درجه بالاتر از دمای اتصال اختصاصی مربوط به هر آغازگر (به ازای هر چرخه یک درجه دما کاهش می‌یابد) و ۱ دقیقه در ۷۲ درجه سلسیوس (جهت بسط) و ۲۵ چرخه شامل ۴۵ ثانیه در ۹۴ درجه سلسیوس (جهت واسرشته‌سازی)، ۴۵ ثانیه در دمای اتصال اختصاصی مربوط به هر آغازگر (جهت اتصال) و ۴۵ ثانیه در ۷۲ درجه سلسیوس (جهت بسط) و بسط نهایی در ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه بود. دمای اتصال جفت آغازگرها به طول و نسبت بازهای G و C به بازهای A و T وابسته است و بین ۵۰ تا ۶۷ درجه سلسیوس متغیر بود. سپس محصولات PCR با استفاده از الکتروفورز ژل پلی‌آکریل‌آمید ۱۰ درصد تفکیک و به روش اتیدیوم بروماید رنگ‌آمیزی و با دستگاه ژل داک عکسبرداری شدند.

ارزیابی ساختار جمعیت و تجزیه ارتباطی: میزان شاخص محتوای اطلاعات چندشکلی^۱ (PIC) با استفاده از

فرمول ارائه شده توسط Botstein (1980) محاسبه شد. جهت انجام تجزیه ارتباطی ابتدا تجزیه ساختار جمعیت انجام شد. به منظور تجزیه مؤثر ساختار جمعیت، دسته‌بندی دقیق ژنوتیپ‌ها به زیرجمعیت‌های مناسب و تشخیص ژنوتیپ‌های مختلط، ارزیابی ساختار جمعیت با استفاده از روش بی‌زین^۲ در نرم‌افزار STRUCTURE 2.3.4 انجام شد. در این روش فرض می‌شود که K زیرجمعیت وجود دارد که هر یک از این زیرجمعیت‌ها با مجموعه‌ای از فراوانی‌های آلی در هر مکان ژنی مشخص شده و در داخل زیرجمعیت‌ها تعادل هاردی-واینبرگ برقرار است. لگاریتم احتمال اینکه هر فرد X متعلق بر هر یک از زیرجمعیت‌های K باشد، محاسبه می‌شود و بر این اساس افراد به زیرجمعیت‌های مختلف منتسب می‌شوند (Pritchard et al. 2000).

¹ Polymorphic information content

² Bayesian

جهت تجزیه ساختار برای جمعیت مورد بررسی تعداد ۱ تا ۱۰ زیرجمعیت فرضی اولیه (K) در نظر گرفته شد و برای افزایش دقت ۱۰ تکرار مستقل برای هر کدام از زیرجمعیت‌ها لحاظ شد. برای تعیین تعداد بهینه K از مدل ترکیبی Admixture و مرتبط بودن فراوانی آلل‌ها با طول دوره Burn-in ۱۰۰۰۰۰ و تعداد تکرار MCMC^۱ ۵۰۰۰۰۰ استفاده شد. برای هر K بر اساس روش (2005) Evanno et al. آماره ΔK محاسبه و تعداد بهینه زیرجمعیت از طریق نرم‌افزار آنلاین STRUCTURE HARVESTER تعیین شد (Earl and vonHoldt 2012; <http://taylor0.biology.ucla.edu/structureHarvester/>). انتساب افراد به زیرجمعیت‌ها مطابق روش Spataro et al. (2011) انجام شد. مطابق این روش هنگامی که ضریب تعلق یک ژنوتیپ به زیرجمعیت خاص ۰/۷ یا بیشتر باشد آن ژنوتیپ به آن زیرجمعیت اختصاص دارد، ولی اگر ضریب تعلق به زیرجمعیت‌ها کمتر از ۰/۷ باشد، آن ژنوتیپ به عنوان ژنوتیپ مخلوط^۲ در نظر گرفته می‌شود. پس از تعیین تعداد K بهینه، ماتریس ساختار جمعیت (Q) بر اساس آن تشکیل شد و به عنوان کوواریانت جهت تجزیه ارتباطی وارد محاسبات گردید.

تجزیه ارتباطی بین داده‌های فنوتیپی و ژنوتیپی به منظور شناسایی نشانگرهای پیوسته با صفت مقاومت به بیماری تغییر رنگ دانه طی دو سال ۱۳۹۶ و ۱۳۹۷ بر اساس مدل خطی عمومی^۳ (GLM) مبتنی بر ماتریس ساختار جمعیت و مدل خطی مخلوط^۴ (MLM) مبتنی بر ماتریس ساختار جمعیت و روابط خویشاوندی^۵ (K) به کمک نرم‌افزار TASSEL 4.1.29 انجام شد (Yu et al. 2006; Bradbury et al. 2007). ماتریس روابط خویشاوندی بر اساس داده‌های ژنوتیپی با نرم‌افزار TASEEL 4.1.29 محاسبه گردید. تجزیه ارتباطی برای هر سال به طور مجزا انجام شد و در هر سال از میانگین تکرارهای هر ژنوتیپ به عنوان مجموعه داده فنوتیپی جهت تجزیه ارتباطی استفاده شد. بعد از انجام تجزیه ارتباطی توسط نرم‌افزار TASSEL به منظور معرفی نشانگرهای مرتبط با صفت جهت کاهش ارتباطات کاذب مثبت بین نشانگر-صفت، تصحیح بنفرونی^۶ روی مقادیر P-value انجام شد. سطح آستانه بنفرونی در این مطالعه برابر با ۰/۰۵/۵۸۸ و ۰/۰۱/۵۸۸ بود، که ۵۸۸ تعداد آلل‌های تولید شده توسط ۱۲۸ نشانگر چندشکل ریزماهواره می‌باشد (Morgan 2003). سپس $-\log_{10}$ سطح احتمال تصحیحی شده بنفرونی جهت شناسایی نشانگرهای مرتبط با صفت مقاومت به تغییر رنگ دانه به کار رفت (Jamali et al. 2017; Kaler and Purcell 2019); نشانگرهایی که مقادیر P-value آنها بیشتر از ۴/۰۷ و ۴/۷۷ بود، به ترتیب در سطح احتمال ۰/۰۵ و ۰/۰۱ ارتباط معنی‌داری با صفت مقاومت به تغییر رنگ دانه را نشان دادند.

¹ Markov Chain Monte Carlo

² Mixed

³ General linear model

⁴ Mixed linear model

⁵ Kinship

⁶ Bonferroni correction

نتایج و بحث

ارزیابی فنوتیپی: نتایج تجزیه واریانس نشان داد بین ژنوتیپ‌ها از نظر درصد شدت تغییر رنگ دانه تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد و ۱ درصد در دو سال ۱۳۹۶ و ۱۳۹۷ وجود داشت (جدول ۲). درصد شدت تغییر رنگ دانه در بین ۹۴ ژنوتیپ مورد بررسی به ترتیب در سال ۱۳۹۶ و ۱۳۹۷ از ۲/۷۱-۷۲/۷۳ و ۴-۷۳/۳۳ درصد متغیر بود. در بین نمونه بذور جمع‌آوری شده از ژنوتیپ‌های مختلف در سال ۱۳۹۶ و ۱۳۹۷، بالاترین درصد شدت تغییر رنگ دانه در Line 120 با میانگین شدت ۷۳/۰۳ مشاهده شد. همچنین رقم‌های دم‌سفید (۲/۷۱ درصد) و حسن‌سرای پیچیده غلاف (۴ درصد) به ترتیب در سال ۱۳۹۶ و ۱۳۹۷، کمترین شدت تغییر رنگ دانه را نشان دادند (جدول ۳). مقایسه درصد شدت تغییر رنگ دانه ژنوتیپ‌های برنج در دو سال ۱۳۹۶ و ۱۳۹۷ نشان داد که شدت بیماری تغییر رنگ دانه اکثر ژنوتیپ‌های برنج در سال ۱۳۹۷ بیشتر از سال ۱۳۹۶ بود که میزان آن در ژنوتیپ‌های مختلف متفاوت بود. با بررسی داده‌های هواشناسی طی مرحله خوشه‌دهی تا رسیدن دانه در دو سال ۱۳۹۶ و ۱۳۹۷ مشخص شد که میانگین میزان بارندگی در سال ۱۳۹۷ (۱/۵ میلی‌متر) بیشتر از سال ۱۳۹۶ (۰/۰۲ میلی‌متر) بود، که سال ۱۳۹۷ را برای کلونیزه شدن خوشه‌های برنج توسط عوامل ایجاد کننده تغییر رنگ لکه مساعدتر می‌سازد. بر اساس منابع موجود وقوع بارندگی‌های پی‌درپی طی مرحله خوشه‌دهی تا رسیدن دانه موجب افزایش شدت بیماری تغییر رنگ دانه در سطح خوشه‌ها می‌شود. بارندگی مکرر و سنگین در این مرحله موجب مرطوب شدن خوشه‌ها شده و آن‌ها را مستعد به حمله انواع عوامل بیماری‌زای تغییر رنگ دانه از قبیل باکتری‌ها و به‌ویژه قارچ‌ها می‌سازد (Padasht-Dehkaei 2015; Ashfaq et al. 2017). در این مطالعه، شدت بیماری تغییر رنگ دانه در ارقام بومی ایرانی نسبت به ژنوتیپ‌های به‌نژادی شده ایرانی و وارداتی کمتر بود که مطابق با نتایج Rostami et al. (2013) و Padasht-Dehkaei (2015) بود. علت آن را می‌توان به کاهش تعداد پنجه و متعاقباً کاهش تراکم کانوپی ارقام بومی ایرانی نسبت به ارقام به‌نژادی شده ایرانی و تفاوت شرایط اقلیمی منشأ جغرافیایی ژنوتیپ‌های وارداتی نسبت به ارقام بومی ایرانی نسبت داد (Padasht-Dehkaei 2015).

تجزیه تنوع ژنتیکی و ساختار جمعیت: در این مطالعه، ۱۴۰ نشانگر ریزماهواره در کل ۶۰۱ آلل تولید کردند که از این تعداد، ۵۸۹ آلل (۹۸٪) چندشکل بودند. میانگین تعداد آلل برای هر لوکوس ۴/۷۹ بود که دامنه آن از ۲ تا ۹ آلل برای هر نشانگر متغیر بود. تمامی نشانگرهای ریزماهواره میزان PIC بالاتر از ۰/۵ را بین ژنوتیپ‌های مورد بررسی آشکار ساختند و میانگین این شاخص برای ۱۲۸ نشانگر چندشکل ۰/۸۲۹ بود. بالاترین میزان PIC در نشانگر RM3739 (۰/۹۶) مشاهده شد، که اشاره بر بیشترین چندشکلی و آگاهی‌بخشی این نشانگر دارد (جدول ۴). آماره PIC یکی از مهمترین معیارهای ارزیابی قدرت تمایز نشانگرها است که معیار دقیق‌تری از میزان تنوع هر ژن را بیان می‌کند و مستقل از تعداد نمونه مورد مطالعه می‌باشد (Botstein et al. 1980). بالا بودن چندشکلی در پژوهش حاضر را می‌توان به کارایی بالای این نشانگرها و وسعت مناطق جغرافیایی منشأ ژنوتیپ‌های مورد بررسی نسبت داد (Nachimuthu et al. 2015).

جدول ۲. خلاصه تجزیه واریانس شدت تغییر رنگ دانه در دو سال ۱۳۹۶ و ۱۳۹۷

Table 2. Analysis of variance for grain discoloration severity in 2017 and 2018

میانگین مربعات Mean square		درجه آزادی Degree of freedom	منابع تغییرات Source of variation
2018	2017		
1.43 [*]	0.81 ^{ns}	2	بلوک Block
7.37 ^{**}	6.77 ^{**}	93	ژنوتیپ Genotype
0.46	0.48	186	خطا Error
13.58	15.69	-	ضریب تغییرات Coefficient of variance

^{ns}، * و **: به ترتیب غیرمعنی‌دار، معنی‌دار در سطح ۵ درصد و معنی‌دار در سطح ۱ درصد

^{ns}، * and **: non-significant, significant at 5% and 1% levels of probability, respectively.

جدول ۳. مقایسه میانگین درصد شدت تغییر رنگ دانه در ۹۴ ژنوتیپ برنج در سال ۱۳۹۶ و ۱۳۹۷

Table 3. Mean comparison of grain discoloration severity in the 94 rice genotypes used in 2017 and 2018

شدت تغییر رنگ دانه Grain discoloration severity					
2018	2017	ژنوتیپ Genotype	2018	2017	ژنوتیپ Genotype
22.70	16.81	دانیال Danial	73.33	72.73	Line 120
23.11	16.41	Line 830	72.22	69.56	Usen
23.41	16.00	گوهر Gohar	64.04	58.22	IR 50
25.74	15.74	گیل ۱ Gil 1	68.52	58.15	سپیدرود Sepidrud
16.33	15.59	کادوس Kadus	55.93	55.37	Line 213
26.30	15.56	محمدی چپرسر Mohammadi-Chaparsar	54.93	51.67	Dcl
15.41	15.22	موسی طارم Moosa-Tarom	56.74	46.56	Line 834
16.52	15.00	Dular	48.56	46.52	CY
19.89	14.63	اهلمی طارم Ahlami-Tarom	46.70	45.04	Zenith
21.63	14.44	حسنی Hasani	50.19	44.59	شفق Shafagh
29.56	14.44	چمپابودار Champa-Budar	45.93	42.78	IR 28

19.59	14.44	طارم امیری Tarom-Amiri	61.85	42.00	زیره بندی Zireh-Bandpey
24.74	14.12	احمدجو Ahmad-Jo	40.93	40.00	Line 835
21.67	14.00	طارم پاکوتاه Tarom-Pakotah	40.48	36.00	Norin 22
13.96	13.70	عنبوری Anburi	44.07	35.37	گیلانه Gilaneh
14.81	13.48	رشتی سرد Rashti-Sard	45.93	35.19	قائم Ghaem
13.63	13.22	IR 36	60.19	34.78	آمل ۲ Amol 2
21.67	13.07	دم‌سیاه سلیمان‌داراب Domsiyah-Soleiman-Darab	50.56	34.74	کوهسار Koohsar
18.78	13.07	شاهپسند Shahpasand	41.11	33.00	آمل ۱ Amol 1
16.07	12.81	Line 338	38.89	32.63	IR 60
15.33	12.56	صدری Sadri	37.04	31.11	سازندگی Sazandegi
17.59	12.30	IR 30	43.11	29.30	زاینده‌رود Zayanderud
14.85	12.22	دم‌سرخ Domsorkh	33.89	28.85	ندا Neda
15.08	12.15	زیره Zireh	28.81	58.59	Tetep
11.96	11.70	مهر Mehr	29.15	28.00	دشت Dasht
15.74	11.46	قصرالدشتی Ghasrodashti	34.15	27.78	ساحل Sahel
13.04	11.41	کشوری Keshvari	51.56	27.48	صالح Saleh
14.33	11.22	درفک Dorfak	29.26	27.04	هویزه Hooveizeh
15.81	9.11	حسن‌سرای Hasan sarai	40.74	26.52	نعمت Nemat
16.33	9.00	سالاری Salari	45.93	26.48	غریب Gharib
9.70	8.93	سنگ‌طارم Sange-Tarom	23.04	25.74	شیرودی Shirudi
12.00	8.78	دشتی Dashti	26.30	25.00	KMP 41
8.48	8.48	دم‌زرد Domzard	36.11	24.63	IR 64
14.30	8.27	طارم منطقه Tarom-Mantaghe	24.19	23.74	Line 839
9.26	8.15	بی‌نام Binam	24.96	23.70	پژوهش Pazhoohesh
7.98	7.78	دم‌سیاه Domsiyah	25.37	23.52	فجر Fajr

14.85	7.19	سنگ جو Sange-Jo	25.93	23.15	تابش Tabesh
7.89	7.15	آبجی بوجی Abjibo-Ji	24.26	22.85	Kanto 51
8.86	6.78	طارم جلودار Tarom-Jolodar	33.33	21.85	دیلمانی Deilamani
7.67	6.74	حسن سرایی آتاشگاه Hasan saraei-Atashgah	45.30	21.78	آمل ۳ Amol3
6.63	6.41	بجار Bejar	23.63	21.74	خزر Khazar
12.33	6.26	میرطارم Mir-Tarom	26.15	19.52	عنبربو Anbarbu
7.33	5.77	گرده Gerdeh	21.52	18.81	پردیس Pardis
10.54	5.48	علی کاظمی Ali-Kazemi	21.85	17.81	طارم محلی Tarom-Mahalli
6.71	5.47	هاشمی Hashemi	21.89	17.56	قشنگه Ghashangeh
4.00	5.00	حسن سرایی پیچیده غلاف Hasan saraei-Pichide ghalaf	18.37	17.37	NP 125
8.87	2.71	دمسفید Domsefid	24.78	17.00	Line 833
28.11	25.73		28.11	25.73	حداقل اختلاف معنی دار Least significant difference

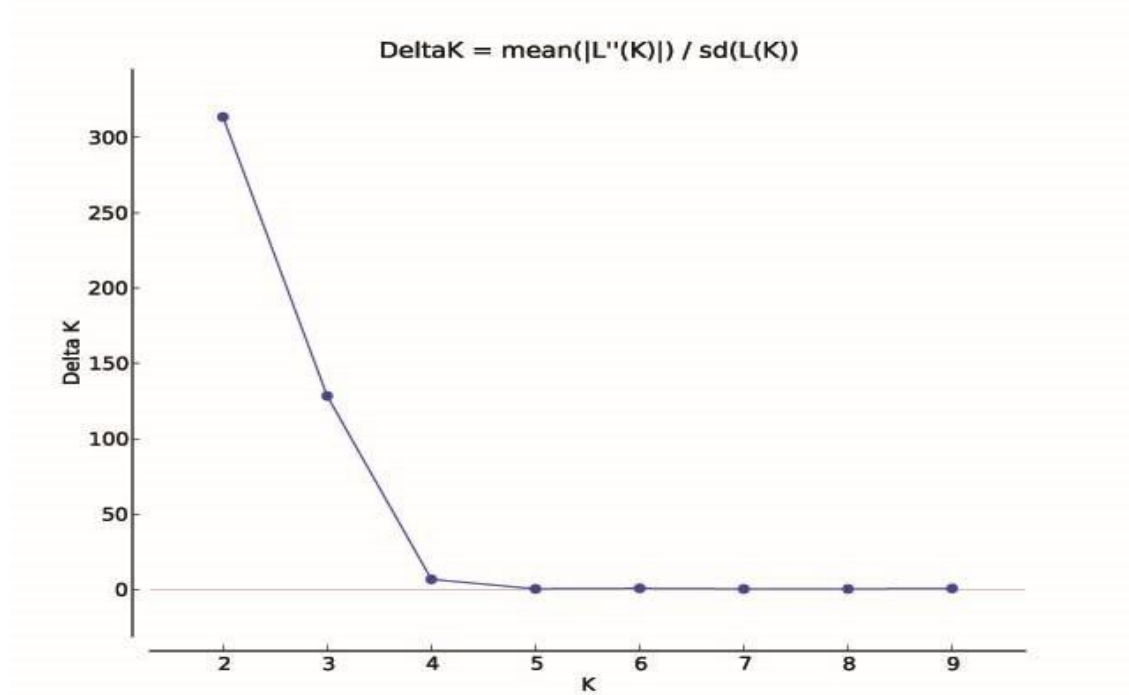
با توجه به پایین‌ترین مقدار LnP (D) و بالاترین مقدار ΔK جمعیت مورد مطالعه به ۲ زیرجمعیت تفکیک شد. $K=2$ به عنوان K بهینه در تخمین ساختار جمعیت و محاسبه ماتریس سهم عضویت افراد در هر کلاستر (ماتریس Q) تعیین شد (شکل ۱). بر اساس نتایج ارائه شده در بارپلات ساختار جمعیت، ۳۶ ژنوتیپ (۳۸/۳۰ درصد) به ساختار اول، ۵۲ ژنوتیپ (۵۵/۳۲ درصد) به ساختار دوم و ۶ ژنوتیپ (۶/۳۸ درصد) به ساختار مخلوط (با احتمال تعلق کمتر از ۷۰ درصد به هر دو زیرجمعیت) منتسب شدند (شکل ۲). بر اساس تجزیه ساختار اکثر ژنوتیپ‌های به‌نژادی شده ایرانی با بخشی از پایه ژنتیکی اخذ شده از ارقام وارداتی (۷۵/۸۶ درصد) همراه با ۲۴ ژنوتیپ وارداتی در یک زیرجمعیت (رنگ سبز) و ۸۷/۸۰ درصد ژنوتیپ‌های محلی به همراه ۱۰/۳۴ درصد ژنوتیپ‌های به‌نژادی شده در کلاستر دیگر (رنگ قرمز) دسته‌بندی شدند. الگوی مشابهی از تجزیه ساختار در مطالعه Raiesi and Sabouri (2015) مشاهده شد. یکسان شدن زیرجمعیت ژنوتیپ‌های به‌نژادی شده ایرانی با ژنوتیپ‌های وارداتی و نیز حالت اختلاط آن‌ها با ارقام بومی ایرانی می‌تواند به دلیل وجود زمینه ژنتیکی مشترک بین ارقام و نیز جریان ژنی به ارقام به‌نژادی شده طی انجام برنامه‌های به‌نژادی باشد. همچنین اکثر ارقام بومی ایرانی به دلیل داشتن ساختار ژنتیک خاص و زمینه یکسان از نظر ژنتیکی و متفاوت از دیگر برنج‌های آسیایی در یک گروه و جدا از سایر ژنوتیپ‌ها (اکثر ژنوتیپ‌های به‌نژادی شده ایرانی و ژنوتیپ‌های وارداتی) قرار گرفتند (Sorkhe et al. 2016).

جدول ۴. مشخصات نشانگرهای ریزماهواره چندشکل مورد استفاده در ارزیابی ژنوتیپی ۹۴ ژنوتیپ برنج و شاخص‌های تنوع ژنتیکی آن‌ها

Table 4. Details of Polymorphic SSR markers used for genotyping in the 94 rice genotypes and their diversity parameters

محتوای اطلاعات چندشکل Polymorphic information content	تعداد آلل چندشکل Number of polymorphic allele	کروموزوم Chromosome	نشانگر Marker	محتوای اطلاعات چندشکل Polymorphic information content	تعداد آلل چندشکل Number of polymorphic allele	کروموزوم Chromosome	نشانگر Marker
0.82	4	6	RM7243	0.86	4	1	RM104
0.90	5	6	RM7551	0.94	8	1	RM5501
0.62	2	6	RM435	0.84	4	1	RM259
0.62	2	6	RM5814	0.90	6	1	RM3740
0.58	2	7	RM6776	0.93	6	1	RM226
0.91	6	7	RM320	0.89	5	1	RM315
0.85	4	7	RM420	0.92	6	1	RM3148
0.88	5	7	RM478	0.84	4	1	RM5302
0.83	4	7	RM1243	0.93	7	1	RM8068
0.79	3	7	RM134	0.51	2	1	RM488
0.84	4	7	RM125	0.94	8	1	RM243
0.83	4	7	RM3555	0.93	7	1	RM220
0.55	2	7	RM427	0.90	5	1	RM128
0.76	3	8	RM3214	0.79	3	1	RM543
0.59	2	8	RM447	0.90	5	1	RM237
0.54	2	8	RM281	0.83	4	2	RM3688
0.75	3	8	RM38	0.59	2	2	RM318
0.85	4	8	RM256	0.94	7	2	RM236
0.84	4	8	RM515	0.77	3	2	RM213
0.90	5	8	RM3572	0.92	6	2	RM324
0.90	5	8	RM6845	0.71	3	2	RM475
0.84	4	8	RM8018	0.91	6	2	RM166
0.62	2	8	RM7027	0.90	6	2	RM7426
0.89	5	8	RM223	0.84	4	2	RM555
0.90	5	8	RM331	0.91	6	2	RM263
0.89	5	9	RM316	0.93	8	2	RM3515
0.89	5	9	RM242	0.92	7	2	RM250
0.93	7	9	RM3909	0.61	2	3	RM175
0.85	4	9	RM201	0.78	3	3	RM282
0.84	4	9	RM205	0.90	6	3	RM570
0.78	3	9	RM566	0.91	6	3	RM135
0.94	7	9	RM7390	0.89	5	3	RM5955
0.89	5	9	RM524	0.95	8	3	RM7576
0.84	4	9	RM3907	0.87	5	3	RM7
0.84	4	9	RM7424	0.62	2	3	RM156
0.85	4	9	RM257	0.77	3	3	RM520
0.58	2	10	RM171	0.62	2	3	RM545
0.62	2	10	RM484	0.78	3	3	RM426
0.90	5	10	RM7545	0.93	8	4	RM3524
0.90	5	10	RM8201	0.62	2	4	RM252
0.86	4	10	RM5620	0.82	4	4	RM261

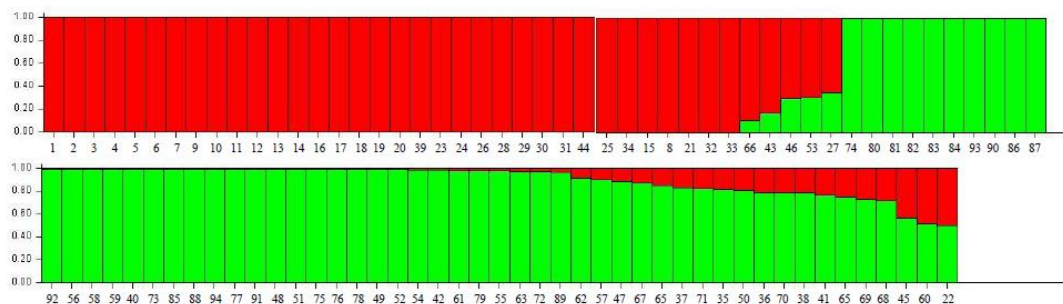
0.92	6	10	RM258	0.85	4	4	RM273
0.92	7	10	RM271	0.94	7	4	RM1359
0.85	4	10	RM6646	0.91	6	4	RM5709
0.91	6	11	RM224	0.82	4	4	RM6314
0.90	5	11	RM3701	0.62	2	4	RM127
0.92	6	11	RM229	0.84	4	4	RM6589
0.78	3	11	RM6623	0.83	4	4	RM6540
0.87	5	11	RM209	0.62	2	4	RM124
0.93	7	11	RM206	0.89	5	5	RM188
0.87	5	11	RM202	0.84	4	5	RM480
0.85	4	11	RM2020	0.92	7	5	RM459
0.84	4	11	RM260	0.79	3	5	RM305
0.55	2	11	RM6499	0.93	7	5	RM289
0.74	3	12	RM17	0.94	8	5	RM3796
0.93	6	12	RM277	0.53	2	5	RM421
0.92	6	12	RM7003	0.89	5	5	RM592
0.88	5	12	RM309	0.87	5	5	RM440
0.77	3	12	RM101	0.85	4	6	RM454
0.86	4	12	RM1880	0.95	9	6	RM3827
0.82	4	12	RM247	0.88	5	6	RM1340
0.78	3	12	RM7619	0.93	6	6	RM30
0.84	4	12	RM519	0.94	8	6	RM276
0.96	9	12	RM3739	0.89	5	6	RM111



شکل ۱. نمودار دو سویه جهت تعیین تعداد مناسب زیر جمعیت (K) در ژنوتیپ‌های برنج مورد مطالعه

Figure 1. Bilateral charts to determine the optimal number of sub-population (K) in the studied rice genotypes

تجزیه ارتباطی: برای شناسایی نشانگرهای پیوسته با صفت مقاومت به بیماری تغییر رنگ دانه در ژنوتیپ‌های مورد مطالعه، مکان‌یابی ارتباطی بر اساس مدل GLM وابسته به ماتریس ساختار جمعیت و مدل MLM وابسته به ماتریس ساختار جمعیت و روابط خویشاوندی انجام گرفت (جدول ۵ و ۶). بر اساس نتایج حاصل از مدل ارتباطیابی GLM بعد از تصحیح بنفرونی، بر مبنای داده‌های فنوتیپی سال زراعی ۱۳۹۶ و ۱۳۹۷، به ترتیب ۱۸ و ۱۳ آغازگر ارتباط معنی‌داری با صفت مقاومت به تغییر رنگ دانه داشتند، که در سال ۱۳۹۶ از این تعداد ۱۲ ارتباط در سطح احتمال ۵ درصد و ۶ ارتباط در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار و در سال ۱۳۹۷، هشت ارتباط در سطح احتمال ۵ درصد و ۵ ارتباط در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار بودند. به طور کلی، ۱۲ نشانگر RM3740، RM8068، RM243، RM213، RM324، RM5955، RM5709، RM276، RM1243، RM515، RM242 و RM7424 ارتباط معنی‌داری با صفت مقاومت به تغییر رنگ دانه طی دو سال ارزیابی نشان دادند که این نشانگرها ۵ تا ۱۶ درصد از واریانس فنوتیپی صفت را توجیه کردند (جدول ۵). در مکان‌یابی ارتباطی با استفاده از مدل MLM بعد از تصحیح بنفرونی، بر مبنای داده‌های فنوتیپی سال ۱۳۹۶، هشت نشانگر ارتباط معنی‌داری با صفت مقاومت به تغییر رنگ دانه را نشان داد که از این تعداد ۶ نشانگر در سطح احتمال ۵ درصد و بقیه در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار بودند. همچنین، بر مبنای داده‌های فنوتیپی سال ۱۳۹۷، پنج نشانگر ارتباط معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد با صفت مقاومت به تغییر رنگ نشان دادند. به طور کلی، با استفاده از مدل MLM، ۳ نشانگر RM5955، RM5709، RM242 و ارتباط معنی‌داری با صفت مقاومت به بیماری را طی دو سال ارزیابی نشان دادند. این نشانگرها ۱۱ تا ۲۱ درصد از واریانس فنوتیپی صفت مقاومت به تغییر رنگ دانه را توجیه کردند (جدول ۶).



شکل ۲. بارپلات تجزیه ساختار ژنوتیپ‌های برنج مورد مطالعه بر اساس ۱۲۸ نشانگر ریزماهوره با استفاده از مدل بی‌زین. هر رنگ یک زیرجمعیت را نشان می‌دهد. محور عمودی ضریب تعلق هر ژنوتیپ به هر کلاستر را نشان می‌دهد. (نام ژنوتیپ‌ها در جدول ۱ ارائه شده است)

Figure 2. Bar plot of structure analysis of the studied rice genotypes according to 128 microsatellite markers using Bayesian model. Each color indicates one sub-population. Vertical axis indicates the membership coefficient of each genotype into sub-population. (The genotypes name has been showed in Table 1)

جدول ۵. نشانگرهای پیوسته با صفت مقاومت به تغییر رنگ دانه در ژنوتیپ‌های برنج مورد مطالعه در مدل خطی عمومی (GLM) مبتنی بر داده‌های فنوتیپی سال ۱۳۹۶ و ۱۳۹۷

Table 5. Significant markers for grain discoloration resistance detected in general linear model (GLM) in 2017 and 2018

2018		2017		کروموزوم Chromosome	نشانگر Marker
ضریب تبیین R ²	-log ₁₀ P-value تصحیح شده -log ₁₀ adjusted P-value	ضریب تبیین R ²	-log ₁₀ P-value تصحیح شده -log ₁₀ adjusted P-value		
0.10	4.35*	0.13	5.52**	1	RM3740
0.12	4.56*	0.11	4.74*	1	RM8068
0.13	4.64*	0.10	4.14*	1	RM243
0.06	4.43*	0.05	4.30*	2	RM213
0.14	5.35**	0.16	6.70**	2	RM324
-	-	0.10	4.58*	2	RM7426
0.12	4.63*	-	-	2	RM236
0.09	4.39*	0.09	4.67*	3	RM5955
-	-	0.10	5.00**	3	RM7
0.15	5.85**	0.13	5.58**	4	RM5709
-	-	0.08	4.57*	5	RM188
-	-	0.08	4.50*	5	RM440
0.14	5.10**	0.14	5.10**	6	RM276
0.06	4.09*	0.06	4.11*	7	RM1243
0.10	5.14**	0.07	4.59*	8	RM515
0.09	4.54*	0.13	5.91**	9	RM242
0.06	4.07*	0.07	4.67*	9	RM7424
-	-	0.09	4.12*	11	RM206
-	-	0.06	4.60*	11	RM6623

-log₁₀ P-value تصحیح شده بعد از آزمون‌های چندگانه (تصحیح بنفرونی P-value) که * و ** به ترتیب اشاره بر معنی‌دار بودن

ارتباط نشانگر در آزمون‌های چندگانه سطوح تصحیح شده ۰/۰۵ و ۰/۰۱ دارد

The -log₁₀ P-value adjusted after multiple tests (Bonferroni correction P-value) where * and ** indicate markers significant at the multiple testing adjusted significance levels of P ≤ 0.05 and 0.01, respectively

جدول ۶. نشانگرهای پیوسته با صفت مقاومت به تغییر رنگ دانه در ژنوتیپ‌های برنج مورد مطالعه بر اساس

مدل خطی مخلوط (MLM) مبتنی بر داده‌های فنوتیپی سال ۱۳۹۶ و ۱۳۹۷

Table 6. Significant markers for grain discoloration resistance detected in mixed linear model (MLM) in 2017 and 2018

2018		2017		کروموزوم Chromosome	نشانگر Marker
ضریب تبیین R ²	-log ₁₀ P-value تصحیح شده	ضریب تبیین R ²	-log ₁₀ P-value تصحیح شده		
	-log ₁₀ adjusted P-value		-log ₁₀ adjusted P-value		
-	-	0.13	4.22*	1	RM3740
0.19	4.49*	-	-	1	RM243
-	-	0.18	4.83**	2	RM324
0.11	4.14*	0.12	4.35*	3	RM5955
0.13	4.13*	0.13	4.22*	4	RM5709
0.17	4.21*	-	-	6	RM276
-	-	0.11	4.47*	7	RM1243
0.16	4.89*	0.21	5.65**	9	RM242
-	-	0.09	4.12*	9	RM7424
-	-	0.12	4.31*	11	RM209

-log₁₀ P-value تصحیح شده بعد از آزمون‌های چندگانه (تصحیح بنفرونی P-value) که * و ** به ترتیب اشاره بر معنی‌دار بودن

ارتباط نشانگر در آزمون‌های چندگانه سطوح تصحیح شده ۰/۰۵ و ۰/۰۱ دارد

The **-log₁₀ P-value** adjusted after multiple tests (Bonferroni correction P-value) where * and ** indicate markers significant at the multiple testing adjusted significance levels of $P \leq 0.05$ and 0.01 , respectively

مهم‌ترین محدودیت کاربرد نقشه‌یابی ارتباطی در گیاهان حضور ساختار و روابط خویشاوندی ناشناخته در جمعیت است. وجود ساختار در جمعیت نقشه‌یابی منجر به شناسایی نشانگرهای غیرمرتبط با صفات هدف می‌شود (اشتباه نوع اول). بنابراین شناسایی جایگاه‌های ژنی که اثری روی فنوتیپ ندارند، قدرت نقشه‌یابی را کاهش می‌دهند (افزایش احتمال اشتباه نوع دوم) (Yu et al. 2016; Zhang et al. 2006). مقایسه دو مدل آشکار کرد که کاربرد روش MLM منجر به کاهش تعداد روابط معنی‌دار می‌شود (سطح احتمال ۵ و ۱ درصد)، ولی برخی از روابط معنی‌دار بین دو روش پایدار بودند. در این مطالعه نشانگرهای ریزماهواره پیوسته با صفت مقاومت به بیماری تغییر رنگ دانه از طریق روش‌های GLM و MLM به ترتیب، به طور میانگین ۱۰ و ۱۴ درصد از تغییرات فنوتیپی را صفت مقاومت به بیماری تغییر رنگ دانه را توجیه کردند (جدول ۵ و ۶). امروزه بیشتر از رویه MLM برای درک ارتباط معنی‌دار بین نشانگر و صفت استفاده می‌شود زیرا در پیدا کردن ارتباط می‌توان هم ماتریس‌های ساختار جمعیت و هم خویشاوندی افراد را دخالت داد و در نتیجه اریب ناشی از این عوامل را کاهش می‌یابد. در این حالت ارتباطات

معنی‌دار شناسایی شده بین نشانگر و صفت از اعتبار و اطمینان بیشتری برخوردارند (Shao et al. 2011; Kumar et al. 2015).

در مقایسه با تجزیه پیوستگی، تجزیه ارتباطی به دلیل بهره‌گیری از تنوع موجود در جمعیت طبیعی و لحاظ کردن تمامی وقایعی که در طول تکامل افراد رخ داده است، وضوح نقشه ژنتیکی را افزایش می‌دهد که می‌توان از آن به راحتی در فرآیند انتخاب به کمک نشانگر استفاده نمود (Agrama et al. 2007; Zhu et al. 2008). تاکنون از نقشه‌یابی پیوستگی برای شناسایی مکان ژنومی صفت مقاومت به تغییر رنگ خوشه و پوسیدگی باکتریایی دانه استفاده شده است. Pinson et al. (2010) دوازده QTLs مرتبط با صفت مقاومت به پوسیدگی دانه و سوختگی باکتریایی خوشه را روی کروموزوم‌های ۱، ۲، ۳، ۷، ۸، ۱۰ و ۱۱ برنج شناسایی کردند. qBPB-3-1، ۱۴ درصد از تغییرات فنوتیپی را طی دو سال ۲۰۰۱ و ۲۰۰۲ توجیه کرد که نزدیک به QTL مرتبط با تاریخ گلدهی قرار داشت. منبع آлл مقاومت این QTL در وارسته مقاوم TeQing شناسایی شد که نزدیک به نشانگرهای RFLP، C515 و RG348x واقع شده بود. در پژوهشی Mizobuchi et al. (2013) یک QTL مقاومت به بیماری پوسیدگی دانه را به نام RBG2 در کولتیوار Kele روی کروموزوم شماره ۱ شناسایی کردند. سپس آن‌ها در سال ۲۰۱۵ به نقشه‌یابی دقیق RBG2 پرداختند. نتایج آن‌ها نشان داد که این QTL در فاصله ۵۰۲ کیلوبازی نشانگرهای ریزماهواره RM1216 و RM11727 واقع شده است (Mizobuchi et al. 2015). به طور کلی مناطق ژنومی پیوسته با عوامل کنترل کننده مقاومت به بیماری تغییر رنگ دانه به کمک دو روش GLM و MLM در دو سال ۱۳۹۶ و ۱۳۹۷ پس از اعتبارسنجی و نقشه‌یابی دقیق می‌توانند در برنامه‌های به‌نژادی برنج برای انتخاب به کمک نشانگر و تولید ارقام مقاوم به این بیماری مفید واقع گردند.

نتیجه‌گیری: نتایج آزمایش حاضر سطح تنوع فنوتیپی قابل ملاحظه‌ای را بین ژنوتیپ‌های مورد بررسی در پاسخ به بیماری تغییر رنگ دانه نشان داد که این تنوع می‌تواند در مطالعه تجزیه ارتباطی حاضر مفید باشد. با توجه به بالا بودن آماره PIC در اکثر نشانگرهای مورد استفاده در این مطالعه می‌توان به کارایی بالای این نشانگرها اذعان داشت و از آن‌ها در برنامه‌های به‌نژادی دیگر به عنوان نشانگرهای مناسب و کارا استفاده نمود. بررسی ساختار جمعیت با ۱۲۸ نشانگر چندشکل ریزماهواره، ژنوتیپ‌ها را به ۲ زیرجمعیت احتمالی تقسیم نمود. در تجزیه ارتباطی بر اساس مدل‌های GML و MLM بعد از تصحیح بنفرونی طی دو سال زراعی به ترتیب ۱۲ و ۳ نشانگر ارتباط معنی‌داری با صفت مقاومت به تغییر رنگ دانه نشان دادند. ارتباط نشانگرهای RM242، RM5709 و RM5955 با صفت مقاومت به بیماری تغییر رنگ دانه به وسیله هر دو روش ارتباطیابی در هر دو سال معنی‌دار بود، که این نشانگرها می‌توانند پس از اعتبارسنجی و نقشه‌یابی دقیق در برنامه‌های به‌نژادی برنج جهت گزینش به کمک نشانگر در خصوص انتخاب والدین مناسب جهت معرفی ژنوتیپ‌های مقاوم به بیماری تغییر رنگ دانه به کار روند.

سپاسگزاری

از مؤسسه تحقیقات برنج کشور و دانشکده کشاورزی دانشگاه لرستان به خاطر فراهم کردن امکانات لازم برای اجرای این پژوهش تشکر و قدردانی می‌شود.

منابع

- پاداشت دهکایی فریدون؛ (۱۳۹۴) مقاومت به بیماری تغییر رنگ دانه در ارقام برنج محلی و اصلاح‌شده ایرانی و چند رقم خارجی در شرایط مزرعه. پژوهش‌های کاربردی در گیاهپزشکی، ۴ (۲)، ۱۳-۲۶.
- رستمی مهدی؛ قاسمی ابوالقاسم؛ رحیمیان حشمت‌الله؛ خسروی وحید؛ (۱۳۹۲) شناسایی، پراکنش و تعیین برخی ویژگی‌های عوامل باکتریایی بیماریزای همراه با تغییر رنگ و سوختگی خوشه برنج در استان مازندران. گیاهپزشکی، ۳۶ (۳)، ۳۱-۴۲.
- رئیس طیبه؛ صبوری عاطفه؛ (۱۳۹۴) اعتبارسنجی و تجزیه ارتباطی نشانگرهای ریزماهوره مرتبط با تحمل به تنش خشکی و شوری در برنج‌های هوازای و ایرانی تحت تنش اسمزی. زیست‌فناوری گیاهان زراعی، ۴ (۱۰)، ۵۷-۷۲.
- واجد ابراهیمی محمدتقی؛ محمدآبادی محمدرضا؛ اسماعیلی‌زاده علی (۱۳۹۶) بررسی تنوع ژنتیکی چهار نژاد از گوسفندان موجود در ایران با استفاده از نشانگرهای ریزماهوره‌ای. فناوری زیستی در کشاورزی، ۱۶، ۵۹-۶۷.
- واجد ابراهیمی محمدتقی؛ محمدآبادی محمدرضا؛ اسماعیلی‌زاده کاشکوئیه علی (۱۳۹۴) بررسی تنوع ژنتیکی پنج جمعیت گوسفند ایرانی با استفاده از نشانگرهای ریزماهوره‌ای. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی ۷ (۴)، ۱۵۸-۱۴۳.
- محمدی‌فر آمنه؛ محمدآبادی محمدرضا؛ (۱۳۹۰) کاربرد نشانگرهای ریزماهوره برای مطالعه ژنوم گوسفند کرمانی. فصلنامه علوم دامی ایران، ۴۲ (۴)، ۳۳۷-۳۴۴.

Reference

- Agrama HA, Eizenga GC, Yan W (2007) Association mapping of yield and its components in rice cultivars. *Mol Breed* 19, 341-356.
- Ashkani S, Rafii MY, Shabanimofrad M et al. (2015) Molecular breeding strategy and challenges towards improvement of blast disease resistance in rice crop. *Front Plant Sci* 16, 1-14.
- Ashfaq M, Mubashar MS, Haider M, Ali A et al. (2017) Grain discoloration: an emerging threat to rice crop in Pakistan. *The J Anim Plant Sci* 27, 696-707.
- Botstein D, White RL, Skolnick M et al. (1980) Construction of a genetic linkage map using restriction fragment length polymorphisms. *Am J Hum Genet* 32, 314-331.
- Bradbury PJ, Zhang Z, Kroon DE et al. (2007) TASSEL: software for association mapping of complex traits in diverse samples. *Bioinformatics* 23, 2633-2635.

- Dallagnol LJ, Rodrigues FA, Mielli MVB, Ma JF (2014) Rice grain resistance to brown spot and yield are increased by silicon. *Trop Plant Pathol* 39, 056-063.
- Earl DA, vonHoldt BM (2012) Structure Harvester: A website and program for visualizing structure output and implementing the Evanno method. *Cons Gen Res* 4, 359-361.
- Evanno G, Regnaut S, Goudet J (2005) Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: a simulation study. *Mol Ecol* 14, 2611-2620.
- IRRI. 2013. Standard evaluation system (SES) for rice. (5th edn), Los Baños, Philippines: International Rice Research Institute.
- Jamali SH, Mohammadi SA, Sadeghzadeh B (2017) Association mapping for morphological traits relevant to registration of barley varieties. *Span J Agric Res* 15, e0704: 1-13.
- Kaler AS, Purcell LC (2019) Estimation of a significance threshold for genome-wide association studies. *BMC Genomics* 20, 618.
- Kardin MK, Percich JA (1983) Resistance of *Bipolaris oryzae* to fenapanil. *Plant Dis* 67, 811-874.
- Kumar V, Singh A, Mithra SA et al. (2015) Genome-wide association mapping of salinity tolerance in rice (*Oryza sativa*). *DNA Res* 22, 133-145.
- Leung H, Zhu Y, Revilla-Molina I et al. (2003) Using genetic diversity to achieve sustainable rice disease management. *Plant Dis* 87, 1156-1169.
- Marchetti MA, Peterson HD (1984) The role of *Bipolaris oryzae* in floral abortion and kernel discoloration in rice. *Plant Dis* 68, 288-291.
- McKinney HH (1923) Influence of soil, temperature and moisture on infection of wheat seedling by *Helminthosporium sativum*. *J Agric Res* 26, 195-217.
- Mew TW, Gonzales P (2002) *A Handbook of Rice Seedborne Fungi*. (1st edn), International Rice Research Institute, Los Banos, Philippines.
- Misra JK, Gergon EB, Mew TW (1990) Organisms causing rice seed discoloration and their possible effect on germinability. *Rice Seed Health Newslett* 2, 9.
- Mizobuchi R, Sato H, Fukuoka S et al. (2013) Mapping a quantitative trait locus for resistance to bacterial grain rot in rice. *Rice* 6, 1-10.
- Mizobuchi R, Sato H, Fukuoka S et al. (2015) Fine mapping of RBG2, a quantitative trait locus for resistance to *Burkholderia glumae*, on rice chromosome 1. *Mol Breed* 35, 15.
- Mobasher-Amini M, Alizadeh MR, Padasht F et al. (2015) Rice grain discoloration effect on physical properties and head rice yield in three rice cultivars. *Qual Assur Saf Crops Foods* 8, 283-288.
- Mohammadifar A, Mohammadabadi MR (2011) Application of Microsatellite Markers for a Study of Kermani Sheep Genome. *Iran J Anim Sci* 42, 337-344. (In Persian)

- Moran MD (2003) Arguments for rejecting the sequential Bonferroni in ecological studies. *Oikos* 100, 403-405.
- Murray MG, Thompson WF (1980) Rapid isolation of high-molecular-weight plant DNA. *Nucleic Acids Res* 8, 4321-4325.
- Nachimuthu VV, Muthurajan R, Duraiyalaguraja S et al. (2015) Diversity in rice germplasm using SSR markers: an initiative towards association mapping of agronomic traits in *Oryza sativa*. *Rice* 80, 30.
- Padasht-Dehkaei F (2016) Resistance to grain discoloration disease in Iranian local and improved, and some foreign rice cultivars in field conditions. *J Appl Res Plant Prot* 4, 13-26. (In Persian)
- Pandey V, Agarwal VK, Pandey MP (2000) Location and seed transmission of fungi in discolored seeds of hybrid rice. *Indian Phytopathol* 53, 45-49.
- Pinson SRM, Shahjahan AKM, Rush MC, Groth DE (2010) Bacterial panicle blight resistance QTLs in rice and their association with other disease resistance loci and heading date. *Crop Sci* 50, 1287-1297.
- Prabhu AS, Barbosa Filho MP, Datnoff LE et al. (2012) Silicon reduces brown spot severity and grain discoloration on several rice genotypes. *Trop Plant Pathol* 37(6), 409-414.
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000) Inference of population structure using multi-locus genotype data. *Genetics* 155, 945-959.
- Raiesi T, Sabouri A (2015) Validation and association analysis of microsatellite markers related to drought and salinity tolerance in aerobic and Iranian rice under osmotic stress. *Crop Biotech* 10, 57-72. (In Persian)
- Rostami M, Ghasemi A, Rahimian HA, Khosravi V (2013) Identification, distribution and characterization of pathogenic bacteria associated with rice grain discoloration and panicle blight disease in Mazandarn province. *Plant Prot* 36, 31-42. (In Persian)
- Shao Y, Jin L, Zhang G et al. (2011) Association mapping of grain color, phenolic content, flavonoid content and antioxidant capacity in dehulled rice. *Theor Appl Genet* 122, 1005-1016.
- Spataro G, Tiranti B, Arcaleni P et al. (2011) Genetic diversity and structure of a worldwide collection of *Phaseolus coccineus* L. *Theor Appl Genet* 122, 1281-1291.
- Sorkhe K, Masaeli M, Hosseini Chaleshtori M et al. (2016) AFLP-based analysis of genetic diversity, population structure, and relationships with agronomic traits in rice germplasm from north region of Iran and world core germplasm set. *Biochem Genet* 54, 177-193.

- Vajed Ebrahimi MT, Mohammad Abadi MR, Esmailizadeh AK (2016) Analysis of genetic diversity in five Iranian sheep population using microsatellites markers. *Agric Biotechnol J* 7, 143-158 (In Persian).
- Vajed Ebrahimi MT, Mohammadabadi MR, Esmailizadeh AK (2017) Genetic Diversity Analysis of Four Sheep Breeds Existing in Iran Using Microsatellite Markers. *Agric Biotechnol* 8, 59-66 (In Persian).
- Yu J, Buckler ES (2006) Genetic association mapping and genome organization of maize. *Curr Opin Biotech* 17, 155-160.
- Yu JM, Pressoir G, Briggs WH et al. (2006) A unified mixed-model method for association mapping that accounts for multiple levels of relatedness. *Nature Genet* 38, 203-208.
- Zhang P, Zhong K, Shahid MQ, Tong H (2016) Association analysis in rice: from application to utilization. *Front Plant Sci* 7, 1-16.
- Zhu C, Gore M, Buckler ES, Yu J (2008) Status and prospects of association mapping in plants. *Plant Genet* 1, 5-20.