

شناسایی نشانگرهای آگاهی بخش مرتبط با صفات ریشه بونج در مراحل اولیه رشد در شرایط تنش خشکی با استفاده از تجزیه ارتباط

حسین صبوری^{۱*}، شریفه محمدآلق^۲ و احمدرضا دادرس^۳

۱ و ۲. دانشیار گروه تولیدات گیاهی و دانشجوی کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه گنبدکاووس

۳. دانشجوی سابق دکتری اصلاح نباتات گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشگاه گیلان

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۹/۲۸ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۱/۲۲)

چکیده

گسترش شبکه ریشه ای عمیق راهکاری مهم برای جلوگیری از تنش خشکی در بونج است. به منظور بهسازی صفات ریشه ای بونج، لازم است در آغاز باید نواحی ژننگانی (ژنومی) کنترل کننده صفات مهم ریشه شناسایی شوند. با این هدف، پژوهشی با استفاده از ۱۹۲ ژنوتیپ بونج در شرایط تنش خشکی و آبکشت (هیدروپونیک) طرح ریزی شد. به منظور اعمال تنش اسمزی از مانیتول با فشار اسمزی ۵- بار در مرحله گیاهچه ای و شرایط آبکشت استفاده شد. افزون بر وزن اندام های هوایی، وزن ریشه، زیست توده و ضخامت ریشه، صفات طول اندام های هوایی و ریشه در طول رشد یعنی در روزهای ۷م، ۱۴م، ۲۱م، ۲۸م و ۳۵م پس از انتقال به محیط آبکشت، ارزیابی شدند. ارزیابی ژنوتیپی افراد جمعیت با استفاده از ترکیب های آغازگری ناشی از آنزیم های محدودگر *EcoRI* و *MseI* انجام شد. برای شناسایی نواحی ژننگانی مرتبط با مکان های کنترل کننده این صفات از پنج مدل آماری با دو رویه *GLM* و *MLM* در نرم افزار TASSSEL استفاده شد. نشانگرهای E100-M140-3، E100-M160-7، E110-M140-9، E100-M140-3، E100-M150-19، E100-M160-7، E100-M160-11 و E110-M140-1 مهم ترین نشانگرها شناسایی شدند. با توجه به اینکه این نشانگرها درصد قابل توجهی از تغییرپذیری های فنوتیپی را تبیین کردند، می توان از این نشانگرها به عنوان نامزد در تحقیقات بعدی از جمله تبدیل آن ها به نشانگرهای اختصاصی SCAR و برنامه های انتخاب به کمک نشانگر برای تحمل به خشکی پس از تأیید استفاده کرد.

واژه های کلیدی: بونج (*Oryza sativa* L.)، تجزیه ارتباط، تنش خشکی، صفات ریشه.

Detection of informative markers associated with rice root traits under drought stress in the growth early stages using association analysis

Hossein Sabouri^{1*}, Sharifeh Mohammad Alegh² and Ahmad Reza Dadras³

1, 2. Associate Professor and M.Sc. Student, University of Gonbad-e-Kavoos, Iran

3. Former Ph.D. Student of Plant Breeding, Department of Agronomy and Plant Breeding, University of Guilan, Iran

(Received: Decw. 19, 2015 - Accepted: Apr. 10, 2016)

ABSTRACT

Developing a deep root system is an important strategy for avoiding of drought stress in rice. In order to improve rice root system, at the first stage, must be detected genomic regions controlling important root traits. In order to achieve this aim, a study was conducted using 192 rice genotypes under drought stress and hydroponic culture. Manitol with 5 bar concentration was used to apply osmotic stress in seedling stage. In addition of shoot mass, root mass, plant mass and root thickness, length of shoot and root were recorded on 7th, 14th, 21th, 28th and 35th days after transferring to hydroponic culture. Genotyping of population was performed using primer combinations of restriction enzymes of *EcoRI* and *MseI*. To identify genomic regions associated with controlling loci of the traits, were used five statistical models with two *GLM* and *MLM* procedures in TASSSEL software. The markers of E100-M140-3, E100-M160-7, E110-M140-9, E100-M140-3, E100-M150-19, E100-M160-7, E100-M160-11, E110-M140-1 and E110-M140-9 were detected as the most important markers. Since these markers explained significant percentage of the phenotype variations, can be used as candidate markers in further studies such as conversion to SCAR markers marker assisted selection for drought stress tolerance after validation.

Keywords: Association analysis, drought tolerance, rice (*Oryza sativa* L.), root trait.

مقدمه

برنج یکی از مهم‌ترین محصولات کشاورزی است که برای بیش از نیمی از جمعیت جهان غذای اصلی به‌شمار می‌رود (Todaka *et al.*, 2012). از سوی دیگر محدودیت‌های محیطی نیز همواره تهدیدی جدی برای تولید محصولات گیاهی از جمله برنج به‌شمار می‌روند. خشکی اصلی‌ترین چالشی است که سازگاری رقم‌های پر محصول برنج به‌ویژه در محیط‌های خشک و دیم برنج را محدود می‌کند (Lafitte *et al.*, 2007). تنش خشکی تا حدودی در ۵۰ درصد از اراضی تولید برنج جهان رخ می‌دهد (Ndjiondjop *et al.*, 2010). گرم شدن کره زمین که در سال‌های اخیر رخ داده است باعث ایجاد آسیب جدی برای مناطقی شده است که کشت برنج در آن متکی بر آب باران بوده و به آب برای آبیاری دسترسی ندارند. بنابراین بهبود تحمل به خشکی در برنج به یک راهکار مهم، برای ایجاد پایداری تولید برنج در مناطق کم آب تبدیل شده است (Yoshida & Hasegawa, 1982). ریشه‌ها اندام اصلی گیاه برای جذب آب و مواد غذایی هستند، بنابراین بهبود درک ما از تعامل بین ریشه و تنش خشکی در برنج می‌تواند تأثیر قابل توجهی در امنیت غذایی جهان داشته باشد (Gowda *et al.*, 2011). گزارش شده که ریشه‌ها در روبرویی با تنش‌های مختلف محیطی، از جمله تنش‌های خشکی و شوری، نقش مهمی در بقا و عملکرد گیاهان زراعی ایفا می‌کنند (Kafi *et al.*, 2009).

تجزیه ارتباطی که به تجزیه LD^۱ (تعادل نداشتن پیوستگی) نیز مرسوم است سازوکار نقشه‌یابی را به گونه مطلوب‌تری نسبت به مکان‌یابی معمول بررسی می‌کند. نخست به دلیل اینکه در این‌گونه بررسی‌ها از جامعه‌های طبیعی استفاده می‌شود تنوع ژنتیکی بیشتری نسبت به جمعیت‌های ناشی از تلاقی دو والدی وجود دارد، دوم اینکه بسته به جمعیت، نقشه‌یابی LD دقت بسیار بالاتری دارد چراکه در این نوع نقشه‌یابی همه رویدادهای میوزی که در طول تاریخچه تکاملی گیاه انباشته شده است در نظر گرفته

می‌شود در صورتی که در روش معمول نقشه‌یابی تنها در شماری از نسل‌های تلاقی یا خودگشنی میوز رخ می‌دهد (Shaaf *et al.*, 2012; María *et al.*, 2015). کاربرد تجزیه ارتباطی، انقلابی در تهیه نقشه‌های ژنتیکی در انسان به وجود آورد (Donnelly, 2008) و امروزه به‌طور قابل توجهی در گیاهان استفاده می‌شود (Nordborg & Weigel, 2008; María *et al.*, 2015). از جمله بررسی Shaaf *et al.* (2012) که برای ارزیابی نشانگرهای SNP مؤثر در گلدهی جو در ژن‌های نامزد (کاندید) Ppd-H1، CO1 و GIGANTEA از تجزیه ارتباطی استفاده کردند. آنان ۵۲ رقم جو ایرانی و خارجی را بررسی کردند. وسعت LD در هر سه ژن متغیر و پایین بود و این محققان نتیجه گرفتند که این دلیلی بر سودمندی روش تجزیه ارتباطی ژن نامزد برای دسترسی به نقشه روشنی از ژن‌های کنترل زمان گلدهی در جو است. Ataee *et al.* (2013) به‌منظور شناسایی نواحی ژنگانی (ژنومی) مرتبط با ریشه از ۱۰۰ رقم جو استفاده کردند و ارزیابی ژنوتیپی را با ۳۹۶۴ SNP با فراوانی بیش از ۱۰ درصد انجام دادند. آنان با استفاده از مدل MLM توانستند ۱۵ QTL برای صفات مورد ارزیابی شناسایی کنند. Jun *et al.* (2008) با استفاده از تجزیه ارتباطی و نشانگرهای SSR، ۱۱ QTL^۲ را برای صفت محتوای پروتئین در ۹۶ نمونه سویا شناسایی کردند که برخی از این QTLها پیشتر شناسایی نشده بود. (Roy *et al.*, 2006) با استفاده از تجزیه ارتباط بر پایه رگرسیون چند متغیره در ۵۵ رگه (لاین) گندم، ۵۵ نشانگر SSR، ۳۸ نشانگر SAMPL و ۵۴ نشانگر AFLP را شناسایی کردند که دست‌کم با یکی از ۱۴ صفت زراعی مورد بررسی مانند عملکرد زیست‌توده و وزن هزاردانه مرتبط بوده و به‌عنوان نشانگرهای مثبت برای برنامه‌های گزینش به کمک نشانگر این صفات معرفی شدند. Uga *et al.* (2011) برای مکان‌یابی QTLهای کنترل‌کننده عمیق‌ترین ریشه (*Dro 1*) از ۱۱۷ رگه خالص نوترکیب به‌دست‌آمده از تلاقی رقم‌های IR64 (رقم با ریشه‌های عمیق) و Kinandang Patong (رقم

با توجه به اهمیت شناخت چگونگی رشد و توسعه اندام‌های مختلف به‌ویژه ریشه که نقش مهمی در جذب آب و مواد غذایی دارد و اینکه نقش این اندام در شرایط تنش خشکی مهم‌تر می‌شود، این پژوهش باهدف شناسایی نواحی ژن‌گانی مرتبط با صفات ریشه برنج تحت تنش خشکی و در شرایط آب‌کشتی با استفاده از تجزیه ارتباطی به‌عنوان یکی از روش‌های پرکاربرد سال‌های اخیر برای بررسی ژنتیکی صفات کمی صورت گرفت.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی این پژوهش ۱۹۲ رقم و رگه (جدول ۱) برنج بود که در آزمایشگاه اصلاح نباتات دانشگاه گنبدکاووس در سال ۱۳۹۱ به‌روش آب‌کشتی کشت شد. بذره‌های رقم‌ها از مؤسسه تحقیقات برنج کشور و مؤسسه بین‌المللی تحقیقات برنج و بذره‌های رگه‌ها از آزمایشگاه اصلاح نباتات دانشکده کشاورزی دانشگاه گنبدکاووس تهیه شد.

با ریشه‌های کوتاه) استفاده کردند. در بررسی آنان QTL کنترل‌کننده ریشه‌های عمیق روی کروموزوم ۹ شناسایی شد که ۶۶/۶ درصد از واریانس فنوتیپی کل را توجیه کرد. Wang *et al.* (2013) با تشکیل ۲۱۵ رگه خالص و نوترکیب به‌دست‌آمده از تلاقی Xieqingzao B (ریشه کوتاه) و R9308 (ریشه بلند) تنها QTL‌های مرتبط با طول ریشه در کروموزوم ۷ را در دو سال با کشت به روش آب‌کشتی (هیدروپونیک) در شرایط عادی مکان‌یابی کردند. Courtois *et al.* (2003) QTL‌های کنترل‌کننده صفات ریشه را با استفاده از رگه‌های خالص نوترکیب که از تلاقی رقم‌های IAC165 و Co39 به‌دست‌آمده بود، در شرایط تنش خشکی ردیابی کردند. آنان از ۱۳۱ نشانگر RFLP و ۵۱ نشانگر ریزماهواره استفاده کردند. در مجموع ۴۲ QTL برای صفات ریشه از جمله بیشترین طول ریشه، ضخامت ریشه و وزن ریشه در لایه‌های مختلف خاک شناسایی کردند.

جدول ۱. نام مواد گیاهی مورد استفاده

Table 1. Names of used plant materials

Number	Line or Variety	Number	Line or Variety	Number	Line or Variety	Number	Line or Variety
1	X23	49	Hasan Sarei Atashgah	97	IR30	145	IR43
2	Bala	50	Lemont	98	Amol 3	146	IR24
3	IR-GKU-SA-AHM.SPD-52	51	TEQING	99	Bojar	147	IR29
4	Cisedane	52	Zireh	100	IR58	148	IR60
5	Yasoj 1	53	Champa Boudar	101	Spidroud	149	Line 416
6	Shahpasan Mazandaran	54	Dular	102	Dorfak	150	Line203
7	IR73885-1-4-3-2-1-10	55	Budda	103	Kadous	151	IR63295-AC209-7
8	Shahpasand	56	Amol 1	104	Milagrosa, Zawa Bandy	152	IR68897A
9	Co 43	57	Bhavani	105	IR71466-75-3-B-1	153	Gohar
10	Kohrang	58	Ali Kazemi	106	IR69513-14-SRN-1-UBN-5-5-B	154	IR 72593-B-13-3-3-1
11	Charam 1	59	Rashti Sard	107	IRBB60	155	IR 71991-3R-2-6-1
12	IR-GKU-SA- AHM.SPD-31	60	Giza 173	108	IR31802	156	R644
13	Charam 3	61	Hasan Saraei Pichideh Ghalaf	109	Norin	157	Yuanjing 7
14	Salari	62	IR 72582-10-1-1-3-1	110	IR69617A	158	Guang122
15	Domsepind	63	IR 72593-B-3-2-1-2	111	Hnankar	159	IR24
16	Anbarbou Ilam	64	Amol 2	112	Manawthukha	160	Giza 181
17	IR-GKU-SA- AHM.SPD-39	65	Ghashangeh	113	Pahk maw peun meuang	161	Giza 159
18	IR-GKU-SA-AN.SPD-62	66	IR-GKU-SA-AN.SPD-21	114	Kasalath	162	Cheng-Hui 448
19	Mir Tarom	67	IR 72579-B-2R-1-3-2	115	Rahashee	163	Gang 16
20	Gardeh	68	Dylamani	116	IR72102-4-159-1-3-3-3	164	Babaomi
21	Gharib Siah Ryhani	69	IR-GKU-SA-AN.SPD-94	117	PSBRc28	165	Diantun 502
22	IR-GKU-SA-SH.IR28-78	70	Basmati 370	118	IR25571	166	MR 159
23	IR-GKU-SA-SH.IR28-1	71	ASD 16	119	Arjantin	167	MR 167
24	IR-GKU-SA-SH.IR28-1	72	Sang Jo	120	IRGC-15092-RT-1031-62	168	TB154E - TB - 2
25	IR-GKU-SA- AHM.SPD-45	73	Rashti	121	Sahel	169	IR66946-3R7811
26	Charam 2	74	IR65192-4B-10-3	122	Dorodzan	170	IR66946-3R178-11
27	Sang Tarom	75	Giza 171	123	IRAT216	171	PSB RC28
28	Hasan Saraei	76	IR HON-215	124	IR60	172	PSB RC66
29	IR-GKU-SA- AHM.SPD-7	77	Yasoj 2	125	FUJIMINURI	173	Apo
30	IR 73678-6-9-B	78	Ahlami Tarom	126	Fajr	174	IR68899B
31	Giza 178	79	IR69626B	127	Sakha	175	IR59673-93-2-3-3R
32	Saleh	80	Tarom Mahalli	128	IR 50	176	IR57515-PM1 8-1-1-SRW 1-1
33	Pusa (Basmatil)	81	Sazandegi	129	ZENIT	177	IR59682-132-1-1-2
34	Domzard	82	Tarom Mantagbeh	130	KANTU-51	178	IR59552-21-3-2-2
35	Abjiboji	83	Ghasraldashti	131	IR28	179	IR60819-34-2-1
36	Madhukar	84	Zayandroud	132	IR57301-158-IR	180	IR62141-114-3-2-2-2
37	Mosa Tarom	85	Binam	133	Gil 1	181	IR59469-B-B-3-2
38	Azocena	86	Domsiah	134	IR36	182	IR50404-57-2-2-3
39	Nemat	87	Anbarbou	135	Ahvaz 1	183	IR55423-1
40	Dasht	88	Sadri	136	IR72	184	IR47686-30-3-2
41	Domsorkh	89	IR-GKU-SA-AN.SPD-45	137	IR63307-4B-24-2	185	IR61979-138-1-3-2-3
42	MosaTarom	90	Musa Tarom	138	PSBRc50	186	IR64616 H
43	IR-GKU-SA-SH.IR28-18	91	Tarom Pakotah	139	USEN	187	IR62829A
44	Gharib	92	Tarom Amiri	140	Gil 3	188	IR47686-30-3-2
45	LEBANT	93	Zirehbandpey	141	IR64	189	IR57515-PM1 8-1-1-SRW 1-1
46	Neda	94	Mohammadi Chaparsar	142	Shafagh	190	IR50404-57-2-2-3/Pagsanjan
47	Hashemi	95	Domsiah Solymandarab	143	Shirodi	191	IR-GKU-SA-AN.SPD-75
48	Hasani	96	Yasoj 3	144	PSBRc86	192	IR58025A

طی طول رشد ارزیابی کرد. گیاهچه‌ها به مدت ده روز درون محلول یوشیدا (Yoshida *et al.*, 1976) که به سینی‌ها اضافه می‌شد قرار داشتند و پس از آن تنش روی گیاهچه‌ها اعمال شد. محلول غذایی هر هفته تعویض شد و pH محلول هفته‌ای سه بار کنترل شد و با محلول‌های اسید هیدروکلریک و هیدروکسید سدیم ۱ نرمال، روی pH برابر با ۵/۵ ثابت نگه‌داشته شد. در طول این مدت صفات طول اندام‌های هوایی و طول ریشه هر هفته اندازه‌گیری و ثبت شد. در انتهای آزمایش نیز وزن اندام‌های هوایی، ضخامت ریشه، وزن ریشه و زیست‌توده همه ژنوتیپ‌ها اندازه‌گیری شدند. از میانگین نمونه‌های هر رقم یا رگه برای انجام تجزیه ارتباطی استفاده شد.

تنش خشکی با ماده اسمتیک Manitol به میزان ۵- بار در هر ظرف کشت اعمال شد. در آغاز بذرها به مدت ۲۰ ثانیه با محلول ۵۰ درصد هیپوکلریت سدیم ضدعفونی و پس از شستشو با آب مقطر سترون (استریل) به پتری حاوی کاغذ صافی منتقل شدند و سطوح بذرها با آب مقطر مرطوب نگه‌داشته شد. بذرها جوانه‌زده با دقت درون سوراخ‌های تعبیه‌شده روی سینی‌های یونولیت هدایت شدند. برای کشت از سینی‌های یونولیت تعبیه‌شده روی شیشه‌های طراحی‌شده با ابعاد ۵×۳۰×۶۰ سانتی‌متر استفاده شد (شکل ۱). محیط کشت شیشه‌ای یادشده به‌گونه‌ای طراحی شد که بتوان طول ریشه و اندام‌های هوایی را در



شکل ۱. ارزیابی ژنوتیپ‌های مورد بررسی در شرایط آبکشتی

Figure 1. Evaluation of genotypes under hydroponic conditions

مرحله دمایی مختلف افزایش شدند. جدول ۲ ترکیب‌های آغازگری استفاده‌شده در تجزیه AFLP را نشان می‌دهد. فرآورده‌های PCR با استفاده از الکتروفورز ژل پلی‌اکریل‌امید ۶ درصد جداسازی و به روش نیترا نقره (Bassam *et al.*, 1991) رنگ‌آمیزی شدند (شکل ۲). همه مراحل مربوط به استخراج DNA و الکتروفورز در آزمایشگاه ژنتیک و گیاه‌شناسی دانشگاه گنبدکاووس در سال ۱۳۹۱ انجام شد. درنهایت هم امتیازدهی نوارها به‌صورت صفر و یک به ترتیب برای حضور نداشتن و حضور نوارها انجام گرفت.

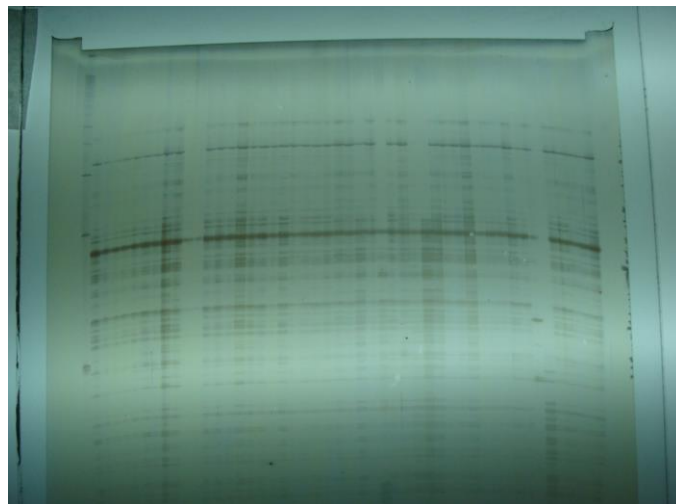
استخراج DNA و انجام AFLP

استخراج DNA به روش (Saghai Maroof *et al.*, 1984) انجام گرفت. روش AFLP بنا بر روش Vos *et al.* (1995) با استفاده از آنزیم‌های محدودگر *EcoRI* و *MseI* تهیه‌شده از شرکت Fermentase انجام شد. در مرحله پیش افزایش، نمونه‌ها با آغازگرهای *EcoRI* و *MseI* دارای یک نوکلئوتید انتخابی در انتهای ۳' افزایش یافتند و فرآورده‌ها پس از رقیق‌سازی به نسبت ۱:۱۰ با ۲۱ ترکیب آغازگری دارای ۲ نوکلئوتید انتخابی دیگر در انتهای ۳'، تحت چرخه گرمایی Touch down شامل سه

جدول ۲. ترکیب‌های آغازگری استفاده‌شده در تجزیه AFLP

Table 2. Primer combinations used for AFLP analysis

<i>EcoRI</i> primers		<i>MseI</i> primers	
Name	DNA sequence	Name	DNA sequence
E060	GACTGCGTACCAATTCAAG	M140	GATGAGTCCTGAGTAAAAC
E070	GACTGCGTACCAATTCAAT	M150	GATGAGTCCTGAGTAAAGA
E080	GACTGCGTACCAATTCACG	M160	GATGAGTCCTGAGTAAAGT
E090	GACTGCGTACCAATTCAC		
E100	GACTGCGTACCAATTCAGT		
E110	GACTGCGTACCAATTCATC		
E120	GACTGCGTACCAATTCATT		



شکل ۲. الگوی نواریندی باندها مربوط به ترکیب آغازگری E090- M150 برای افراد ۱ تا ۴۸

Figure 2. AFLP banding patterns obtained from the amplification of primer combination E090- M150 for genotype 1 to 48

ارتباطی بین داده‌های فنوتیپی و ژنوتیپی با نرم‌افزار TASSEL انجام گرفت.

در این پژوهش تجزیه‌ارتباطی با پنج مدل (سه مدل GLM و دو مدل MLM) برای صفات ریشه‌برنج و دیگر صفات مورد بررسی در شرایط تنش خشکی با کشت به‌روش آبکشتی انجام شد (جدول ۳). برای هر مدل نشانگرهای آگاهی‌بخش (نشانگرهای آگاهی‌بخش به نشانگرهایی اطلاق می‌شوند که در تجزیه‌ارتباطی، ارتباط معنی‌داری را با صفت مورد نظر نشان دهند)، سطح معنی‌داری و ضریب تبیین نشانگر شناسایی‌شده نشان داده شده‌اند (جدول ۵).

جدول ۳. پنج مدل آماری استفاده‌شده برای ارتباط

نشانگرهای AFLP و صفات فنوتیپی

Table 3. Five used statistical models to evaluated relationship AFLP markers and phenotypic traits

Model	The used data set
GLM ^a :1	Phenotype+ AFLP
GLM:2	Phenotype+ AFLP+Q ^b
GLM:3	Phenotype+ AFLP+PC ^c
MLM ^d :4	Phenotype+ AFLP+K ^e
MLM:5	Phenotype+ AFLP+K+Q

a مدل خطی عمومی

b داده‌های ساختار جمعیت یا اصل و نسب استنباط شده از افراد

c مؤلفه‌های اصلی

d مدل خطی مخلوط

e داده‌های خویشاوندی به‌دست‌آمده از همسانی کلی افراد از لحاظ زمینه

ژنتیکی ناشی از خویشاوندی

a. General linear model

b. Population structure data

c. Principal component

d. Mixed linear model

e. Kinship data obtained from general similarity of individuals in genetic background arising the kinship.

تجزیه‌های آماری

پس از تشکیل ماتریس ۰ و ۱ به‌دست‌آمده از نشانگرهای AFLP، تجزیه‌خوشه‌ای با استفاده از نرم‌افزارهای 1. NTSYSps-2 (Rohlf, 2000)، GGT (Tamura *et al.*,) MEGA5.1 و (Van Berloo, 1999) انجام گرفت و در نهایت بهترین نمودار شجره‌ای (دندروگرام) انتخاب شد. برای انجام تجزیه‌ارتباطی، در آغاز ماتریس ساختار ژنتیکی رگه‌ها با استفاده از نرم‌افزار STRUCTURE (Pritchard *et al.*,) (2000) تشکیل شد و چون در مورد ساختار جمعیت اطلاعات پیشین در دست نبود، در این نرم‌افزار شمار بهینه K (از ۱ تا ۱۰) با همانندسازی با طول دوره ۱۰۰۰۰۰ Burnin و شمار تکرار ۱۰۰۰۰۰ MCMC صورت پذیرفت. پس از انجام همانندسازی برای تعیین شمار بهینه K (شمار گروه‌ها) از دو ستون خلاصه‌شده K و LnP(D) برای محاسبات استفاده و برای هر K، میانگین L(K) و انحراف معیار (Stdev) تکرارها محاسبه شد. سپس L'(K) و L''(K) محاسبه و در نهایت از این محاسبات ΔK تعیین شد. در صورتی‌که نمودار دو طرفه K و ΔK رسم شود نقطه اوج منحنی همان شمار بهینه K خواهد بود برای محاسبه شمار زیرجمعیت (K) از روش (Evanno *et al.*, 2005) استفاده شد. پس از تعیین ماتریس ساختار، تجزیه

1. Markov Chain Monte Carlo

نتایج و بحث

تجزیه ساختار جمعیت به منظور شکستن کل جمعیت به زیرجمعیت‌هایی با ساختارهای متفاوت محتمل را امکان‌پذیر می‌سازد. زیرجمعیت‌های تشکیل‌شده از لحاظ ژنتیکی متمایز از هم هستند و چنانچه ژنوتیپ‌هایی به صورت اختلاط یافته باشند پس از انجام این تجزیه قابل تشخیص خواهند بود. در تجزیه ساختار یک جمعیت می‌تواند از لحاظ ساختار ژنتیکی که ناشی از تفاوت فراوانی همردیف ژنی (آلی) و آماره F رایت^۱ است به زیر گروه‌های مختلف تقسیم شود. (Pocovi & Mariotti, 2015; Pritchard *et al.*, 2000). نتیجه تجزیه ساختار جمعیت، یک ماتریس Q است که میزان شباهت نسبی ژنوتیپ‌ها در زیرگروه‌ها (K) را مشخص می‌کند. افزون بر ماتریس Q، برای فراهم کردن تحلیل‌های بیشتری از ساختار جمعیت، Hardy & Vekemans (2002) ماتریس Kinship را ارائه کردند. ماتریس Kinship نشان‌دهنده میزان همانندی دو مکان همسان (همولوگ) بین افراد یک جمعیت است. هنگامی که دو فرد در یک مکان همسان آلی همانند دارند، این آلی وضعیت همانندی آن‌ها را بیان می‌کند. بنابراین تعیین ساختار با استفاده از

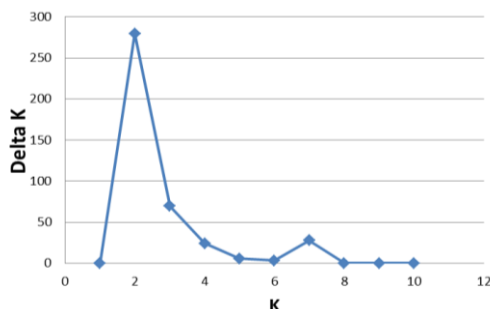
ماتریس Kinship دقت برآورد فاصله ژنتیکی بین افراد را افزایش می‌دهد (Hwang, 2008). Yu *et al.* (2006) مدل خطی مخلوط (MLM) را که ماتریس ساختار و ماتریس Kinship هر دو در آن گنجانده شده است را برای تنظیم ساختار جمعیت گونه‌های گیاهی پیشنهاد کردند.

بخشی از نتایج تجزیه ساختار روی اطلاعات ژنوتیپی افراد جمعیت در جدول ۴ آورده شده است. این جدول آماره‌های محاسبه‌شده برای تعیین میزان K برای رگه‌های مورد بررسی را نشان می‌دهد و شکل ۳ نمودار دو طرفه برای تعیین میزان بهینه K را نشان می‌دهد. در این شکل میزان K و ΔK از نتایج مربوط به همانندسازی در نرم‌افزار STRUCTURE استخراج شد. میزان بهینه K نقطه اوج منحنی است که با توجه به نمودار، بهترین K در این بررسی ۲ است. بنا بر نتایج و بر پایه روش Spataro *et al.* (2011) یک ژنوتیپ هنگامی می‌تواند به انتساب یک گروه درآید که درصد عضویت آن بیشتر از ۰/۷ باشد و در صورتی که درصد عضویت کمتر از ۰/۶۹ باشد به‌عنوان ژنوتیپ مخلوط در نظر گرفته می‌شود. بنابراین ۹۶ ژنوتیپ در گروه ۱ و ۹۶ ژنوتیپ دیگر در گروه ۲ قرار گرفتند.

جدول ۴. آماره‌های محاسبه‌شده برای میزان بهینه K با استفاده از نرم‌افزار STRUCTURE

Table 4. Calculated statistics for the optimal value K using the software STRUCTURE

K	LN(AVR)	STDEV	L'(K)	L''(K)	[L'K]	Delta K
1	-35419.1	0.519157	-	-	-	-
2	-29550.4	14.28389	5868.7	-3991.21	3991.214	279.4207
3	-27672.9	10.42844	1877.486	-724.786	724.7857	69.50087
4	-26520.2	18.48736	1152.7	-447.886	447.8857	24.22659
5	-25815.4	78.81273	704.8143	-448.286	448.2857	5.687986
6	-25558.8	84.87288	256.5286	275.2	275.2	3.242496
7	-25027.1	157.032	531.7286	-4341.34	4341.343	27.64623
8	-28836.7	10088.29	-3809.61	-1317.23	1317.229	0.13057
9	-33963.6	19765.3	-5126.84	2878.143	2878.143	0.145616
10	-36212.3	16264.7	-2248.7	2248.7	2248.7	0.138256



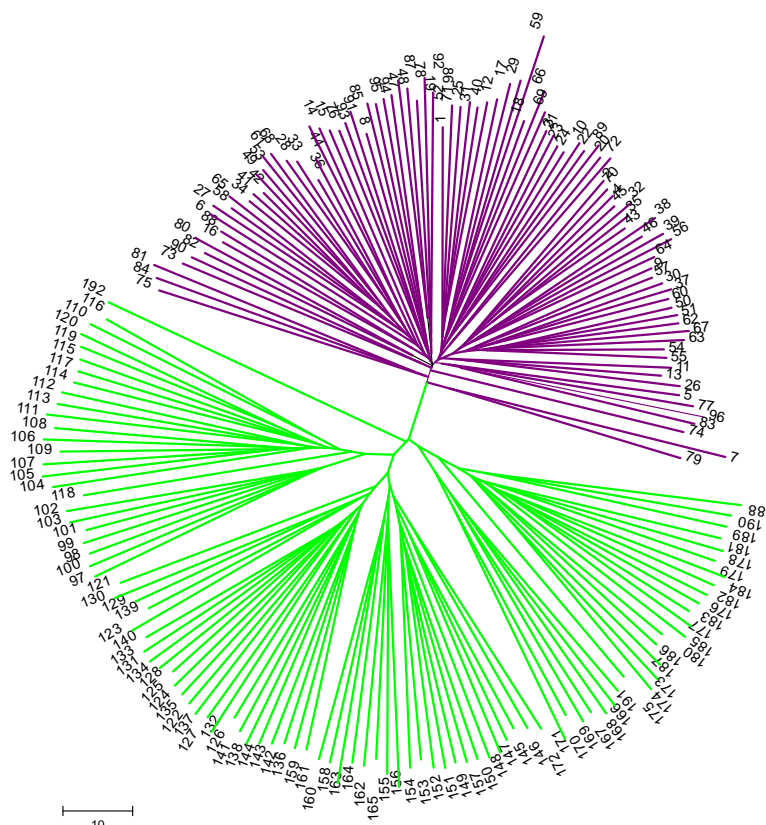
شکل ۳. نمودار دو طرفه برای تعیین شمار بهینه K

Figure 3. Two way graph to determine the optimum number of K

کرد. برای طول اندام‌های هوایی در روز ۲۱ام ۱۱ نشانگر به‌عنوان نشانگر آگاهی‌بخش معرفی شدند که نشانگرهای معنی‌دار شناسایی شده در دو مدل MLM یکسان بودند. این نشانگرها شامل E060-M150-7، E060-M160-12، E060-M160-14 و E110-M140-8 بودند. نشانگرهای E110-M140-9 و E100-M160-7، E100-M140-3 بالاترین درصد تغییر فنوتیپی این صفت را به خود اختصاص دادند. برای صفت طول اندام‌های هوایی در روز ۲۸ام در مدل GLM هیچ نشانگری یافت نشد و در مدل MLM نشانگرهای E060-M150-4، E070-M160-5 و E090-M160-14 شناسایی شد که در دو مدل رویهٔ MLM یکسان بود. در ارتباط با طول اندام‌های هوایی در روز ۳۵ام، در مجموع ۱۵ نشانگر پیوسته به QTL‌های این صفت شناسایی شد. نشانگر E100-M160-7 در مدل دو به‌تنهایی ۵۰ درصد از تغییر فنوتیپی را توجیه کرد و دیگر نشانگرها در این مدل نیز درصد توجیه بالایی داشتند.

همچنین انجام تجزیهٔ خوشه‌ای منجر به تشکیل نمودار شجره‌ای ارائه شده در شکل ۴ شد. این نمودار گروه‌بندی رگه‌ها بر پایهٔ الگوریتم نزدیک‌ترین همسایه‌ها با ماتریس فاصلهٔ ژنتیکی جاکارد را نشان می‌دهد. لازم به یادآوری است که بهترین نوع جداسازی افراد با استفاده از این روش به‌دست‌آمده شد.

برای صفت طول اندام‌های هوایی در روز ۷ام، ۱۰ نشانگر شناسایی شد که نشانگر E110-M160-3 در مدل‌های ۱ و ۳ و نشانگر E100-M160-7 در سه مدل ۲، ۳ و ۴ مشترک بودند همچنین نشانگرهای معنی‌دار شناسایی شده در دو مدل MLM نیز همخوانی داشتند. برای صفت طول اندام‌های هوایی در روز ۱۴ام، ۱۵ نشانگر پیوسته به QTL‌های این صفت شناسایی شدند از بین این نشانگرها، نشانگرهای دو مدل MLM مشترک بودند. نشانگر E110-M140-1 در مدل GLM به‌تنهایی تا حدودی ۳۰ درصد تغییر فنوتیپی این صفت را توجیه



شکل ۴. نمودار شجره‌ای به‌دست‌آمده از تجزیهٔ خوشه‌ای به روش اتصال همسایگی (Neighbor Joining) و ضریب همسانی جاکارد با نشانگرهای مولکولی AFLP (نام ژنوتیپ‌ها در جدول ۱ آورده شده است).

Figure 4. Dendrogram of the cluster analysis caused neighbor joining method and Jaccard coefficient AFLP markers. (The genotypes name has been showed in table 1)

پیشنهاد *Yu et al.* (2006) بهتر است مدل خطی مخلوط (MLM) را که ماتریس ساختار و ماتریس Kinship هر دو در آن گنجانده شده است برای تنظیم ساختار جمعیت گونه‌های گیاهی استفاده کرد. آوردن نتایج همه مدل‌ها امکان مقایسه آن‌ها را فراهم می‌کند و می‌توان تعیین کرد که چه نشانگرهایی پیوستگی دروغین و چه نشانگرهای پیوستگی حقیقی دارند.

Wen et al. (2009) تجزیه ارتباط را با استفاده از روش MLM و نشانگرهای SSR برای شناسایی محل‌های مرتبط با سه صفت زراعی تاریخ سنبله‌دهی، ارتفاع بوته و طول خوشه روی کروموزوم ۷ انجام دادند و توانستند مکان‌های مرتبط را شناسایی کنند. در بررسی که به منظور تجزیه ارتباط برای صفات مهم زراعی در برنج‌های ژاپنی صورت گرفت، با استفاده از ۱۲۸ رقم ارتباط بین ۱۵۲ نشانگر ریزماهواره و یازده صفت زراعی بررسی و با استفاده از مدل MLM ۱۶ نشانگر مرتبط به صفات اندازه‌گیری شده شناسایی شد (*Zhou et al.*, 2012). تحقیقات بسیار اندکی درباره نتایج تجزیه ارتباط ژنگان کامل برنج گزارش شده است و هنوز بررسی‌های زیادی نیاز است تا از منابع ذخائر توارثی (ژرم پلاسما) برنج برای ارتباط با صفات ژنتیکی سودمند و پیچیده بهره گرفت.

Dadras et al. (2014) تجزیه ارتباط هفت صفت مهم زراعی و عملکرد شامل شاخص سطح برگ، ارتفاع بوته، شمار برگ، وزن تر و وزن خشک برگ، طول و عرض برگ را در توتون با استفاده از نشانگرهای AFLP (ترکیب‌های آغازگری *EcoRI/MseI*) انجام دادند. آنان در تجزیه ارتباط از چهار مدل آماری استفاده کردند. و اظهار داشتند ترکیب آغازگری E110-M160-23 برای دو صفت شاخص سطح برگ و عملکرد وزن تازه برگ توتون معنی‌دار شناسایی شده است. افزون بر این آن‌ها با مدل MLM کامل شمار نه نشانگر شناسایی کردند که برای بیش از چند صفت معنی‌دار بودند. آنان همچنین پیشنهاد کردند به منظور تأیید اثر این نواحی در کنترل ژنتیکی این صفات، باید از زمینه‌های مختلف ژنتیکی استفاده شود تا صورت تأیید کاندید مناسبی برای تبدیل به نشانگرهای اختصاصی SCAR باشند.

همچنین برای طول ریشه در روز ۷ام شمار ۲۴ نشانگر به‌عنوان نشانگرهای پیوسته به QTL‌های کنترل‌کننده این صفت شناسایی شد. نشانگر E110-M160-3 در دو مدل ۱ و ۲ و افزون بر این نشانگر E100-M160-7 در مدل‌های ۲، ۴ و ۵ به‌صورت مشترک معنی‌دار بودند. شمار نشانگرهای مرتبط با طول ریشه در روز ۱۴ام، ۱۷ عدد بودند. نشانگرهای E070-M160-11 و E080-M160-2 در هر دو مدل MLM شناسایی شدند. در ارتباط با طول ریشه در روز ۲۱ام، در مجموع پنج مدل شمار ۱۴ نشانگر پیوسته به QTL‌های این صفت ردیابی شد؛ که بالاترین ضریب تبیین به نشانگر E100-M140-3 با توجیه ۳۱ درصد از تغییرپذیری‌های این صفت در دو مدل GLM اختصاص داشت. برای صفت طول ریشه در روز ۲۸ام، ۱۶ نشانگر معرفی شد که از این شمار ۵ نشانگر در مدل GLM و ۱۱ نشانگر در مدل MLM شناسایی شد که نشانگرهای دو مدل MLM باهم مشترک بودند. در ارتباط با طول ریشه در روز ۳۵ام در مجموع ۵ نشانگر مرتبط با این صفت معرفی شد.

شمار ۱۳ نشانگر مرتبط با وزن اندام‌های هوایی در مدل‌های ۲، ۴ و ۵ شناسایی شدند و نشانگر E110-M160-2 در هر سه مدل یافت شد. برای وزن اندام‌های هوایی ۲۱ نشانگر و برای زیست‌توده ۱۲ نشانگر مرتبط با این صفات مکان‌یابی شد. نشانگرهای شناسایی شده برای صفت ضخامت ریشه تنها در دو مدل رویه MLM یافت شدند که این نشانگرها (E100-M150-، E080-M140-10، E070-M160-10) 3، E110-M160-2) در هر دو مدل این رویه یکسان بودند. در مجموع نشانگرهای شناسایی شده در مدل MLM بیشتر از مدل GLM بود، افزون بر آن درصد توجیه فنوتیپی صفات در مدل ۲ در رویه MLM بیشتر از دیگر مدل‌ها بود. این نشانگرها نامزدی مناسبی برای تحقیقات بیشتر هستند تا در صورت تأیید درستی پیوسته بودن این نشانگرها با نواحی ژنگانی مهم در کنترل صفات بتوان با اطمینان بیشتری در برنامه‌های اصلاحی انتخاب به کمک نشانگر بهره برد. در مقایسه مدل‌های مختلف مورد استفاده از این پژوهش باید خاطر نشان کرد که بنا بر

جمله این نشانگرها می‌توان به نشانگر E110-M160-8 اشاره کرد که با صفات طول اندام‌های هوایی در روزهای ۷م، ۱۴م و ۲۱م و همچنین نشانگر E100-M140-3 که با صفات طول ریشه در روزهای ۷م، ۱۴م، ۲۱م و ۲۸م مرتبط بودند، بنابراین می‌توان دریافت که برخی از این صفات می‌توانند پیوستگی ژنتیکی بسیار نزدیکی با همدیگر داشته باشند و یا احتمال وجود پلیوتروپی در نواحی ژنگانی وجود دارد. برای درک این موضوع مکان‌یابی‌های دقیق روی بخش کوچکی از ژنگان که در این پژوهش به‌عنوان نواحی نامزد معرفی شدند با استفاده از نسل‌های در حال تفرق و خاص ضروری است. همچنین این نواحی ژنگانی مهم شناسایی شده که در کنترل بیش از یک صفت مهم نقش داشتند و درصد قابل توجهی از تغییرات صفت را توجیه کردند، در صورت تأیید با آزمایش‌های تکمیلی می‌توانند به نشانگرهای اختصاصی SCAR تبدیل شده و برای غربال جمعیت‌ها و انتخاب به کمک نشانگر استفاده شوند.

سپاسگزاری

این پژوهش مستخرج از طرح تحقیقاتی شماره ۶/۵۸۱ مصوب تاریخ ۹۰/۱۲/۱ دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشکده گنبدکاووس است. لذا از مدیریت پژوهشی و فناوری دانشگاه برای تأمین مالی قدرانی می‌کنیم. از سرکار خانم دکتر عاطفه صبوری که زحمت بازخوانی مقاله را تقبل کردند تشکر می‌شود. از جناب آقای دکتر عباس بیابانی و مهندس رسول خاتمی‌نژاد، جعفر گیلکی و رضا کریم کشته و سرکار خانم‌ها محبوبه نجار عجم، ماهم پیراسته به‌خاطر تلاش‌هایشان در اجرای طرح، تشکر و قدرانی می‌گردد.

Kang *et al.* (2010) به‌منظور انجام تجزیه ارتباطی نشانگرهای AFLP و تحمل به تنش غرقابی در آغاز از بین ۴۰۰ رقم سویا با استفاده از سنجش میزان آسیب‌دیدگی و تحمل به تنش غرقابی، سه رگه متحمل (KAS160-15، KAS170-9 و KAS150-9) و سه رگه حساس (KAS160-14، KAS160-20 و KAS201-6-1) را انتخاب کردند. برای تجزیه نشانگر AFLP از ۸ آغازگر *EcoRI* و ۸ آغازگر *MseI* برای تهیه ۳۲ ترکیب آغازگری استفاده کردند. آنان شمار ۱۰ قطعه افزایش‌شده چندشکل را که تنها در رگه‌های متحمل یا حساس افزایش شده بودند، در آغاز تعیین توالی کرده و سپس به نشانگر STS تبدیل کردند و به نام‌های GmWT01 تا GmWT06 و GmWS01 تا GmWS04 نام‌گذاری کردند. این نشانگرها که در حقیقت پیوسته به تحمل به تنش غرقابی شناسایی شدند یک تک قطعه افزایشی تولید می‌کنند. آنان همچنین از این نشانگرهای STS تولیدشده برای برنامه‌های انتخاب به کمک نشانگر استفاده کردند.

نتیجه‌گیری کلی

با توجه به نتایج این تحقیق نشانگرهای E100-M140-3، E110-M140-9 و E100-M160-7 تغییرپذیری‌های فنوتیپی صفت طول اندام‌های هوایی در روز ۲۱م و نشانگرهای E100-M140-3، E100-M150-19، E100-M160-7، E100-M160-11 و E110-M140-1 تغییرات فنوتیپی صفت طول اندام‌های هوایی در روز ۳۵م را بیش از ۴۰ درصد توجیه کردند که می‌توانند در برنامه‌های اصلاحی گزینش به کمک نشانگر استفاده شوند همچنان که نتایج نشان می‌دهد برخی از نشانگرها با بیش از یک صفت ارتباط نشان می‌دهند از

REFERENCES

1. Ataee, R., Mohammadi, V. A., Taleii, A. & Naghavi, M. R. (2013). Association mapping in barley roots. *Iranian Journal of Field Crop*, 44(2), 347-357. (In Farsi)
2. Bassam, B. J., Caetano-Anolles, G. & Gresshoff, P. M. (1991). Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. *Analytical Biochemistry*, 196: 80-83.
3. Courtois, B., Shen, L., Petalcorin, W., Carandang, S., Mauleon, R. & Li1, Z. (2003). Locating QTLs controlling constitutive root traits in the rice population IAC 165 × Co39. *Euphytica*, 134: 335-345.
4. Dadras, A. R., Sabouri, H., Mohammadinejad, Gh., Sabouri A. & Shoai-Deylami, M. (2014). Association analysis, genetic diversity and structure analysis of tobacco based on AFLP markers. *Molecular Biology Reports*, 41(5), 3317-3329.

5. Donnelly, P. (2008). Progress and challenges in genome-wide association studies in humans. *Nature*, 456, 728-731.
6. Evanno, G., Reganut, E. & Goudet, J. (2005). Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology*, 14, 2611-2620.
7. Gowda, V. R. P., Henry, A., Yamauchi, A., Shashidhar, H. E. & Serraj, R. (2011). Root biology and genetic improvement for drought avoidance in rice. *Field Crops Research*, 122(1), 1-13
8. Hardy, O. J., & Vekemans, X. (2002). SPAGeDi: a versatile computer program to analyse spatial genetic structure at the individual or population levels. *Molecular Ecology Resources*, 2(4), 618-620.
9. Hwang, E. Y. (2008). *Association analysis in soybean*. Ph.D. Thesis. University of Maryland, College Park.
10. Jun, T. H., Van, K., Kim, M. Y., Lee, S. H. & Walker, D. R. (2008). Association analysis using SSR markers to find QTL for seed protein content in soybean. *Euphytica*, 62, 179-191.
11. Kafi, M., Borzuee, A., Salehi, M., Kamandi, A., Masumi, A. & Nabati, J. (2009). *Physiology and environmental stress in plants*. (Pp 500). Jihad-e-Daneshgahi Mashhad Publications, Mashhad, Iran.
12. Kang, S. Y., Lee, K. J., Lee, G. J., Kim, J. B., Chung, S. J., Song, J. Y., ... & Kim, D. S. (2010). Development of AFLP and STS markers linked to a waterlogging tolerance in Korean soybean landraces. *Biologia Plantarum*, 54(1), 61-68.
13. Lafitte, H. R., Yongsheng, G., Yan, S. & Li, Z. K. (2007). Whole plant responses, key processes, and adaptation to drought stress: the case of rice. *Journal of Experimental Botany*, 58, 169-175.
14. Álvarez, M. F., Mosquera, T. & Blair, M. W. (2014). The use of association genetics approaches in plant breeding. *Plant Breeding Reviews*, 38, 17-68.
15. Ndjiondjop, M. N., Cisse, F., Futakuchi, K., Lorieux, M., Manneh, B., Bocco, R. & Fatondji, B. (2010). Effect of drought on rice (*Oryza spp.*) genotypes according to their drought tolerance level. *Innovation and Partnerships to Realize Africa's Rice Potential, Second Africa Rice Congress, Bamako, Mali*, 22-26.
16. Nordborg, M. & Weigel, D. (2008). Next-generation genetics in plants. *Nature*, 456, 720-723.
17. Pocovi, M. I. & Mariotti, J. A. (2015). A bayesian approach to inferring the genetic population structure of sugarcane accessions from INTA (Argentina). *Chilean Journal of Agricultural Research*, 75(2), 152-159.
18. Pritchard, J. K., Stephens, M. & Donnelly, P. (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155, 945-959.
19. Rohlf, F. (2000). NTSYS-PC, Numerical Taxonomy System for the PC ExeterSoftware, Version 2.1. Applied Biostatistics Inc Setauket, USA.
20. Roy, J.K., Bandopadhyay, R., Rustgi, S., Balyan, H.S. & Gupta, P.K. (2006). Association analysis of agronomically important traits using SSR, SAMPL and AFLP markers in bread wheat. *Current Science*, 5, 683-689.
21. Saghai-Marouf, M. A., Soliman, K. M., Jorgensen, R. A. & Allard, R. W. (1984). Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences*, United States of America 81: 8014-8018
22. Shaaf, S., Bihamta, M., Talee, A. & Naghavi, M. R. (2012). Association analysis of single nucleotide variation in flowering time genes Ppd-H1, HvCO1 and HvG1 in the atmosphere (*H. Vulgare*). *Journal of Modern Genetics*, 7(2), 179-191.
23. Spataro, G., Tiranti, B., Arcaleni, P., Bellucci, E., Attene, G., Papa, R., Spagnoletti Zeuli, P. & Negri, V. (2011). Genetic diversity and structure of a worldwide collection of *Phaseolus coccineus* L. *Theoretical Applied Genetics*, 122, 1281-1291.
24. Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. & Kumar, S. (2011). MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Evolutionary Genetics Analysis*, 28(10), 2731-2739.
25. Todaka, D., Nakashima, K., Shinozaki, K. & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2012). Toward understanding transcriptional regulatory networks in abiotic stress responses and tolerance in rice. *Rice*, 5(1), 6.
26. Uga, Y., Okuno, K. & Yano, M. (2011). *Dro1*, a major QTL involved in deep rooting of rice under upland field conditions. *Journal of Experimental Botany*, 62(8), 2485-2494.
27. Van Berloo, R. (1999). GGT: Software for the display of graphical genotypes. *Journal of Heredity*, 90, 328-329.
28. Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijmans, M., Lee, T. V. D., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M. & Zabeau, M. (1995). AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*, 23, 4407-4414.

29. Wang, H., Xu, X., Zhan, X., Zhai, R., Wu, W., Shen, X., Dai, G., Cao, L. & Cheng, S. (2013). Identification of qRL7, a major quantitative trait locus associated with rice root length in hydroponic conditions. *Journal of Breeding Science*, 63, 267-274.
30. Wen, W., Mei, H., Feng, F., Yu, S., Huang, Z., Wu, J., Chen, L., Xu, X. & Luo, L. (2009). Population structure and association mapping on chromosome 7 using a diverse panel of Chinese germplasm of rice (*Oryza sativa* L.). *Theoretical Applied Genetics*, 119, 459-470.
31. Yoshida, S. & Hasegawa, S. (1982). The rice root system: its development and function. In: Proceedings of *Drought resistance in crops with emphasis on rice*. Los Banos, Philippines: International Rice Research Institute, 97-114.
32. Yoshida, S., Forno, D. A., Cock, J. H. & Gomez, K. A. (1976). *Laboratory manual for physiological studies of rice*. IRRI, Los Banos, Philipines.
33. Yu, J., Pressoir, G., Briggs, W. H., Vroh Bi, I., Yamasaki, M., Doebley, J. F., McMullen, M. D., Gaut, B. S., Nielsen, D. M., Holland, J. B., Kresovich, S. & Buckler, E. S. (2006). A unified mixed-model method for association mapping that accounts for multiple levels of relatedness. *Nature Genetics*, 38, 203-208.
34. Zhou, J., You, A., Ma, Z., Zhu, L. & He, G. (2012). Association analysis of important agronomic traits in japonica rice germplasm. *Journal of Biotechnology*, 11(12), 2957-2970.