تحليل التنوع الوراثي لبعض أصناف الرز *Oryza sativa* L. باستعمال تقنية المايكروستلايت microsatellite-markers

زينة ثامر عبد الحسين الرفيعي[1] نضال عبد الحسين مسان[2]
مدرس مساعد أستاذ مساعد
drbio444@gmail.com nidhal1976@yahoo.com
كلية العلوم[1] – جامعة كربلاء
كلية التربية للبنات [2] – جامعة الكوفة

المستخلص

قدر التنوع الوراثي لأحد عشر صنف من الرز *Oryza sativa L* باستخدام مؤشرات الجزيئية بتعاون مع مركز أبحاث المشخاب في محافظة النجف الاشرف. استخدم مؤشرات التكرار المتسلسل البسيطة Simple Sequence RepeatsالمعتمدSequence على تفاعلات البلمرة المتسلسلة إذا تم عزل الدنا من أوراق الرز بعد 25 يوم من الزراعة باستخدام عده استخلاص Genomic DNA plant kit Protocol حصل على كمية دنا جيده تراوحت (125 – 589) نانوغرام /ميكروليتر بنقاوة قدرها 1.8 -1.9 . تم ترحيلها العينات على هلام الاكاروز بعد إكمال برامج PCR،أظهرت النتائج الحصول على 64 اليل باستخدام 13 بادئ تراوحت أحجامها الجزيئية بين (115.423-1015.402)زوج قاعدي بلغت أعلى عدد اليلات 8 اليل سجلها البادئ RM3412 اما اقل عدد اليلات بلغ 2 اليلات سجلها الالبادئ RM201وRM 10772 ، إما التعدد الشكلي Polymorphism information content (PIC) الذي يمثل انعكاس لتنوع الاليلي والتكرار الاليلي بين الأصناف تراوحت قيمته بين(0.0830 -0.8434) . كما تراوحت قيم التنوع الوراثي بين 0.0868- 0.8595 إذا سجل البادئ RM3412 أعلى قيم للتنوع الوراثي أما اقل تنوع وراثي سجله البادئ RM10772 . سجل أيضا البادئRM3412 أعلى قيم لمتباينة الزيجة Heterozygote. كما تمكن كل من بادئ (RM3412 ، وRM8085) من إعطاء بصمة وراثية مميزة لثلاث اصناف الوراثية قيد الدراسة . اقل بعد وراثي بلغ 0.3269 بين الصنفين عنبر البركة و فرات1 وهذا يدل على وجود اعلى درجة تشابه بين الصنفين . إن نسبة التشابه الوراثي لجميع الأصناف تراوحت بين (0.1154 - 0.6731) اعتماد على قيم البعد الوراثية التي تراوحت بين (0.8846 -0.3269) التي تشير إلى نسبة تنوع الوراثي كبير تراوحت بين (88% - 32%) وهذا يكشف عن تباين وراثي عالي بين الأصناف مما يجعلها مصادر وراثية غنية. بينت نتائج التحليل التجميعي عن تكون مجموعتين رئيسية (Main Cluster) عند مستوى تشابه مقداره 0.12

مفتاح الكلمات :التنوع الوراثي ،الرز ، مؤشرات التكرار المتسلسل البسيطة

***بحث مستل من اطروحة دكتوراه**

Analysis of the genetic diversity of Some rice varieties using microsatellite-markers technology

Z. Th. Abdul- Hussain AL-Refeay[1]
Assistant Lecturer
drbio444@gmail.com

N. Ab.H. Messan Al–Badeiry[2]
Assistant Professor
nidhal1976@yahoo.com

[1]College of Sciences -University of Karbala
[2]College of Education -University of Kufa

Abstract

genetic diversity of the eleven varieties of *Oryza sativa* L using molecular indicators collaboration with Mashkhab research center in the Najaf. Use polymerase chain reaction based the indicators Simple Sequence Repeats ,the DNA isolated from fresh leaves rice after 25 days from sowing using Genomic DNA plant kit Protocol . the amount of DNA in good range (125-589) ng/µl purity of 1.8-1.9 . after agarose gel electrophoresis & staining with ethidium bromide. results showed that 64 alleles using 13 primers. The range of molecular size between (1015.402−115.423bp). RM3412 primer reached the highest number of 8 alleles While the lowest number of alleles of 2 alleles recorded RM201,RM10772 primers. The Polymorphism information content (PIC), which is a reflection of the diversity of allelic and repetition allelic between varieties ranged value between (0.0830− 0.8434) . As ranged genetic dimension values between (0.0868 −0.8595) . Record all of the primer RM3412 higher values Heterozygote reached 1. this primers (RM3412 and RM8085) to give a distinctive genetic fingerprinting of three varieties under study. The lowest genetic distance 0.3269 between varieties 2 and 3 this means there is a high degree of similarity. The genetic similarity of all varieties and compositions ranged betwee (0.1154 - 0.6731) depend on the genetic distance that ranging from) (0.8846− 0.3269) which refers to the large genetic diversity ranged from(%32− %88))and this reveals a high genetic variation between varieties making it hereditary rich sources. Results showed of the Cluster analysis to 2 major groups (Main Cluster) at the level of the similarity of 0.12..

Key words: genetic diversity, Rice(Oryza sativa L), microsatellite-markers

المقدمة

التنوع الوراثي Genetic diversity هو الركيزة الأساسية في التنوع البايولوجي ومن أهم المجالات لتغلب على الاجتهادات الحيوية والغير حيوية ، أثبتت المؤشرات الجزيئية كفاءتها في دراسة التنوع الوراثي وتميزت مؤشرات microsatellite–markers او المقاطع البسيطة المتكررة (SSR) Simple Sequence Repeats في دراسة التنوع الوراثي لنباتات والحيوانات ودراسة العلاقة الوراثية (1) و(2) ورسم الخرائط الوراثية وتساعد في عملية الانتخاب (3) وتحديد مواقع الصفات الكمية Quantitative Trait Loci Qtl (4) و في

تحليل الطفرات(5) .إذا تتوزع في جميع مناطق الجينوم كما يمكن إن تكون موجودة في البلاستيدات(6) وجينوم المايكوندريا(7) تمتاز هذه المؤشرات بوفرة وجودها وتوزيعها العالي في جينوم حقيقية النوى ولها القدرة على التميز بين الأنواع المختلفة والأصناف للنوع الواحد والتميز بين السلالات الصنف الواحد. لكونه ذات سيادة مشتركة وتكشف عن مستوى عالي من التباين Polymorphism (8)(9)كما لها القدرة على التميز بين النباتات الهجينة والنقية وراثيا أو الخلطيه وراثيا ويمكن استخدامها في دراسة المجتمعات او العشائر التي تمتلك إعداد كبيرة ، كما تمتاز هذه المؤشرات بعدم احتياج لكمية كبيرو من الحامض النووي ولا يتطلب ان يكون ذو جودة عالية لان البادي طويل وتمتاز بدقتة ونجاحها كما تمتاز هذه الطريقة بتركيز على إظهار التباينات الوراثية في المناطق الجانبية لمواقع المكررات الترادفية الموجودة بصورة طبيعية في مجين الكائن بينما في مؤشرات الـAFLP يقوم الباحث ببناء تلك الجوانب.

إما معوقات هذه المؤشرات تكلفتها عالية وان دراسة التباينات الوراثية للبادئ الواحد تكون حصرا على موقع وراثي واحد ولا يمكن تطبيقه على أنواع أخرى ويجب معرفة التتابع النيوكليدات المحيطة بمناطق SSR لتصميم البادئات (10).كما إن تصميم البادئ تتطلب وقتا وخبرة كبير.

بين الباحث (11)عند دراسة لتنوع الوراثي لاصناف الرز وجود تباين وراثي عالي بين 21 صنف من الرز الأسيوي باستخدام 34مؤشر من نوع SSR وكانت عدد الاليلات الكلية 142بواقع 2-11 اليل لكل موقع وبمعدل 4.18 ، كما تم اكتشاف 24 اليل فريد من نوعها في 14 موقع حيث يمكن استخدامها لتحديد الهوية وتوصيف الجزيئي ، اما قيمة محتوى التعدد الاشكال تراوحت بين 0.157-0.838 وبمعدل بلغ 0.488 وهذا يدل على وجود اختلاف واضح بين الأصناف وعند إجراء رسم الشجرة الوراثية قسمة الاصناف الى خمسة مجاميع وبمعدل تشابه يصل الى 0.50 ،تميزت اليلات خاصة بالأصناف العطرية وهذا مفيد في تحديد بصمة الحامض النووي لاستخدامها في برامج التربية والتهجين .

بين(12)عند تقيم التنوع الوراثي لرز باستخدام خمسة المؤشرات من (SSR) المرتبطة بمدة النمو وبعدد أيام التزهير إن عدد الاليلات الكلية بلغت 17 اليل وبمعدل 5.66 اليل لكل موقع وأعلى نسبة تكرار للاليلات بلغت 0.70% إما محتوى تعدد الإشكال تراوحت بين 0.35 – 0.798 وبمعدل 0.54 إما قيم التنوع الوراثي تراوحت بين 0.46-0.82 وبمعدل 0.59 كما قسمة التراكيب الوراثية إلى أربعة مجاميع وبمعامل تشابه قدر بـ0.39 عند رسم الخريطة لوراثية او الشجرة العلاقة الوراثية ويمكن الاستفادة من هذه النتائج في تحديد الخطوط الرز المناسبة في الانتخاب واختيار الإباء في التهجين ذات مدة النمو القصيرة .

لاحظ (13)عند تحليل التنوع الوراثي لرز الأسيوي باستخدام مؤشرات الدنا من نوع SSR استخدام 24 سلالة محلية مع أربعة أصناف عالية الإنتاجية لغرض تحديد التركيب الوراثي المميز لتحسين الحاصل ومعرفة البعد الوراثي بينها . إذا اظهر التحليل ألتجمعي لرسم الشجرة الوراثية توزيع التراكيب الى ستة مجاميع وبمعامل تشابه بلغ 0.17 فقط ، وان عدد الاليلات الكلي بلغ 321 اليل وبواقع 6-12 اليل لكل موقع وبمعدل 11.88 اليل

وان أعلى نسبة تكرار لاليل بلغت 0.40 إما أعلى قيم لتنوع الوراثي بلغت 0.85 اما محتوى تعدد الإشكال تراوحت بين 0.68الى 0.94 وبمعد ل 0.84 وان هذه النتائج مهمة جدا لانتخاب الإباء ومعرفة التركيب المميز.

لذا جاءت هذه الدراسة لتسليط الضوء على جانب التنوع الوراثية لأصناف الرز(.Oryza sativa L) داخل العراق واحتسابه ضمن أولويات التنمية الزراعية باستخدام طرق حديثة كفيلة بضمان تمييز الحدود وتعيينها بين الأصناف أو الضروب ليتسنى تشخيصها، وتحديد البصمة الوراثية الخاصة بكل صنف للاستفادة منها في مختلف المجالات

المواد وطرائق العمل Materials and Methods

جمع النماذج النباتية Collection of plant samples

جمعت العينات بالتعاون مع محطة أبحاث الرز في المشخاب / محافظة النجف الأشرف ، لأحد عشر صنف والتي يجري إكثارها ذاتيا ضمن خطة وزارة الزراعة في العراق. وكما مبين في(جدول **رقم1**) .

جدول1: الأصناف والتراكيب الوراثية المدروسة مع مصدرها واصل نشؤها.

ت	اسم التركيب الوراثي	المصدر Source	أصل النشوء Pedigree
1	اباء 1	محطة أبحاث الرز في المشخاب	فيتنام مركز اباء – تحمل ملوحة
2	عنبر البركة	محطة أبحاث الرز في المشخاب	هندي
3	فرات 1	محطة أبحاث الرز في المشخاب	تايلندي- المعهد ابحاث الرز العالمي Research International Rice Institute(irri)
4	غدير	محطة أبحاث الرز في المشخاب	فيتنام - المعهد ابحاث الرز العالمي Research International Rice Institute(irri)
5	برنامج 4	محطة أبحاث الرز في المشخاب	المعهد ابحاث الرز العالمي Research International Rice Institute(irri)
6	ياسمين	محطة أبحاث الرز في المشخاب	فتنام
7	بحوث 1	محطة أبحاث الرز في المشخاب	تركي
8	عنبر 33	محطة أبحاث الرز في المشخاب	صنف محلي قديم
9	دجلة	محطة أبحاث الرز في المشخاب	صيني
10	مشخاب 2	محطة أبحاث الرز في المشخاب	صنف محلي -ادخل المعهد ابحاث الرز العالمي Research International Rice Institute (irri) هوصنف يتحمل الجفاف تذكر بسيت الاستيراد
11	مشخاب 1	محطة أبحاث الرز في المشخاب	صنف محلي –ادخل المعهد ابحاث الرز العالمي Research International Rice Institute (irri)

الدراسة الجزيئية Molecular study

تم عزل الدنا من الأوراق بعد 25 يوم من الزراعة حسب طريقة (Saghai-Maroof واخرون1984). طبقا لخطوات العزل المرفقة بعدت الاستخلاص Genomic DNA plant kit Protocol المجهزة من شركة Geneaid ،بعدها استخدم جهاز bio drop لقياس تركيز الدنا اذا تعد خطوة مهمة من ضمن خطوات الاستخلاص الدنا من النبات (Sambrook واخرون 1989).ثم اجري الترحيل الكهربائي وفقا ل(39).

البادئات Primers

جهزت البادئات المعتمدة في هذه الدراسة من قبل شركة Bioneer في شكل مجفد Lyophilized وكان عددها 17 بادئ، وتم تحضيرها باستعمال دارئ TE للحصول على التركيز النهائي (المحلول الأصلي) 100 بيكومول/ مايكروليتر، ومن هذا المحلول تم تحضير البادئ الذي يستعمل في تفاعل البلمرة بتركيز 10 بيكومول/ مايكروليتر. (جدول رقم 2)

جدول 2: أسم البادئ وتسلسل النيوكليوتيدات.

المصدر	تسلسل النيوكليوتيدات (5’→ 3’)	Repeat motif	رقم الكرموسوم	اسم البادئ	ت
M. R. Islam et al (2011)	Forward : AAGTTTGTACACATCGTATACA Reverse: CGCGACCAGTACTACTACTA	(AT)31	1	RM8094	1
M. R. Islam et al (2011)	Forward :AAAGCAGGTTTTCCTCCTCC CCCATGTGCAATGTGTCTTC Reverse:	(TA)34	1	RM3412	2
M. R. Islam et al (2011)	GGAAAGAATGATCTTTTCATGG Forward : Reverse: CTACCATCAAAACCAATGTTC	(GA)18	8	RM25	3
M. R. Islam et al (2011)	GGTGATTAATTACTGGTCGGAAGG Forward GCTGGTTTGATCGGAATTACAGG Reverse:	(TA)42	10	RM25519	4
Mehede et al (2014)	GCACACCATGCAAATCAATGC Forward : CAGAAACCTCATCTCCACCTTCC Reverse:	(CTT)16	1	RM10772	5
Md et al (2015)	Forward :CTTACAGAGAAACGGCATCG Reverse: GCTGGTTTGTTTCAGGTTCG	(CTT)18	7	RM336	6
Mehede et al (2014)	CACATGGCACCAACCTCC Forward : Reverse: GCCAAGTCATTCACTACTCTGG	(GA)10	9	RM296	7
Md et al (2015)	AACCGGATTAGTTTCTCGCC Forward : Reverse: TGAGGACGACGAGCAGATTC	(GA)15	6	RM510	8
Md et al (2015)	Forward :CAGTCTTGCTCCGTTTGTTG Reverse: CTGTGACTGACTTGGTCATAGG	(TC)45	6	RM585	9
Kanbar &Shashidhar,2011	CTCGTTTATTACCTACAGTACC Forward : CTACCTCCTTTCTAGACCGATA Reverse:	(CT)17	9	RM201	10
Swamy et al (2011)	Forward :CCACTTTCAGCTACTACCAG CACCCATTTGTCTCTCATTATG Reverse:	(CT)24	1	RM212	11
Salunkhe et al(2011)	TCATGTCATCTACCATCACAC Forward : Reverse: ATGGAGAAGATGGAATACTTGC	(GT)30(AT)8	1	RM302	12
Salunke et al., 2011	Forward :AAAGCCCCCAAAAGCAGTAC Reverse: GTGAAACTCTGGGGTGTTCG	(GA)21	1	RM3825	13
Salunkhe et al (2011)	TGCGTTTCGATTTCTTTTTA Forward : GGAAAGTTGTGTTCTTTGGC Reverse:	(AG)26	1	RM8085	14
Qu et al., (2008)	GTAGTGAGCCTAACAATAATC Forward : Reverse: TCAACTCAGCATCTCTGTCC	(GA)17	9	RM278	15
Vikram et al (2010) .	GAGGTACTTCCTCCGTTTCAC Forward : Reverse: AGTCAGCTCACTGTGCAGTG	(AT)4(GT)10	1	RM315	16
Li et al., 2009	TGGAGTTTGAGAGGAGGG Forward : Reverse: CTTGTTGCATGGTGCCATGT	(CT)17	1	RM259	17

خليط التفاعل: Reaction Mixture (Master Mix)

جهز خليط التفاعل الرئيسي Master mix من قبل شركة Bioneer في أنابيب خاصة معقمة

الدليل الحجمي لـ DNA   DNA Molecular Size of Markers

جهز الدليل الحجمي المستعمل في هذه الدراسة من قبل شركة Bioneer – USA بتركيز 150 ng/$\mu\ell$. ، وبحجم 250 مايكروليتر ومدى يتراوح من 25 – 2000 زوج قاعدي (17 حزمة) ،

تفاعل البلمرة المتسلسل Polymerase Chain Reaction

إذ تم تطبيق المؤشر الجزيئي المعتمد في هذه الدراسة SSR من خلال تقنية PCR وفق البرنامج التالية:

البادئ	المراحل	درجة الحرارة	الوقت
جميع البادءات نفس البرنامج	مسخ الدنا الابتدائية	95C°	5دقيقة
	عدد الدورات 35 دورة		
	مسخ الدنا	95C°	30 دقيقة
	الالتحام	55C°	30 دقيقة
	الاستطالة	72C°	1 دقيقة
	الاستطالة النهائية	72C°	5 دقيقة

بعد انتهاء وقت التفاعل رفعت الأنابيب من جهاز المبلمر الحراري وتم سحب 10 مايكروليتر من الأنابيب وتحميلها بحفر هُلام الآكاروز المحضر مسبقاً بتركيز 1.5%، مع تحميل الدليل الحجمي DNA ladder على أحد الجوانب. ثم رحلت العينات وذلك بتشغيل جهاز الترحيل الكهربائي Electrophoresis لمدة ساعة واحدة. بعدها تعريض الهلام للأشعة فوق البنفسجية على جهاز الـ Gel documentation system للتصوير.

تحليل البيانات Data Analysis

باستخدام uvband تم معرفة عدد الحزم المتضاعفة وأوزانها الجزيئية وبعدها تم تحويل بيانات التوصيف Characterization data يدويا إلى جداول تبين وجود الحزمة عن عدمها لكل عينة من العينات المدروسة وذلك بوضع 1 عن وجود الحزمة و0عند غيابها. تم حساب محتوى التعدد الشكلي Information Content Polymorphism (PIC) والتنوع الوراثي وحساب عدد الاليلات واعلى تكرار للاليل باستخدام برنامج Power Marker 3.25 (21) .

استخدم برنامج past3 لغرض حساب :

اولا– أ – تقدير قيم التشابه استناداً على مكافئ Jaccards (Jaccard's coefficient) والتي يتم حسابها كما يأتي:

S= nxy/nt – nz

nt = عدد الحزم الكلية

nz =عدد الحزم غير الموجودة في A و B ولكن موجودة في بقية العينات المدروسة

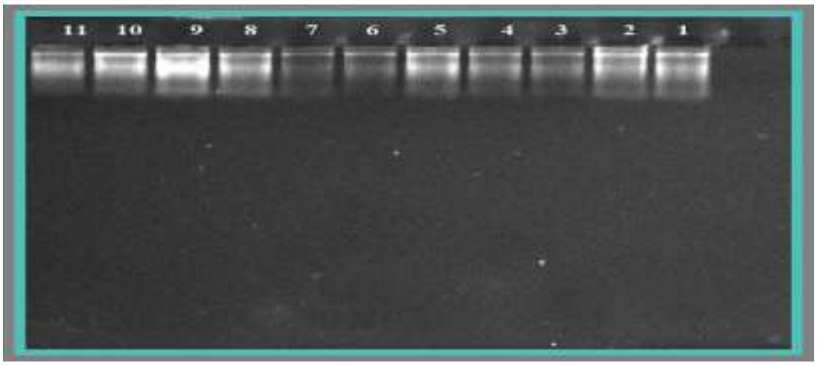
ب- اما الاختلاف dissimilarity فيقاس بطرح قيمة التشابه من 1 أي تساوي (1- S).

ثانياً: التحليل التجمعي Cluster لبناء الشجرة الوراثية Dendrograme بطريقة UPGMA يعتمد على معامل البعد الوراثي والتكرار الاليلي بجمع الأفراد المتشابهة جداً في مجموعة واحدة ثم ترتبط المجاميع المتشابهة معاً وهكذا إلى ان يتم ادخال كل العينات المدروسة بمجموعة واحدة

النتائج والمناقشة :

عزل جينوم الحامض النووي للرز **Genomic DNA Isolation**

تراوحت تركيز الحامض النووي المعزول(125 - 589) نانوغرام /ميكرليتر بنقاوة قدرها 1.8- 1.9تم تحديدها بجهاز biodrop بنسبة A 280 – A260 وكان الحجم الجزيئي للعينات50الى 150 Kb لان الطريقة المتبعة في الاستخلاص طريقة كفوءة وملائمة لعزل الدنا من النباتات كما تمتاز بالسريعة والبساطة اذا تعمل المواد الكيمياوية المكونة لمحاليل العزل على إزاحة إحدى مكونات الخلية غير المرغوبة و المحافظة على الحامض النووي المستخلص.استخدم نسبة 1.5الاكاروز لترحيل الكهربائي (شكل 1) لتقيم مستوى الحامض النووي المعزول إذا يعمل جهاز الترحيل على فصل الحزم حسب الأوزان الجزيئية فالحزم ذات الوزن الجزيئي الصغير ترحل إلى مسافات ابعد و أسرع من الحزم ذات الوزن الجزيئي الكبير. أظهرت نتائج الفصل الكهربائي إن الحزم اغلبها اقرب إلى أعلى الهلام يدل موقعها وشدتها إلى كونها ذات نوعية جيدة وإحجامها الجزيئية عالية كما قدرت نوعية الحامض النووي من خلال تألق العينات باستخدام صبغة الاثديوم برومايد ethidium bromide.



شكل 1: يوضح عينات الدنا المعزولة من اصناف الرز والمرحلة على1.5 %هلام الاكاروز وتمثل الارقام تسلسل الاصناف كمايلي : 1-اباء ، 2-عنبرالبركة ، 3- فرات1، 4-غدير ، 5- برنامج4 ،6- ياسمين ،7-بحوث1 ،8-عنبر33، 9- دجلة 10- مشخاب2 ،11 – مشخاب1

تحليل تقنية التكرارات الترادفية البسيطة (Simple Sequence Repeats(SSR

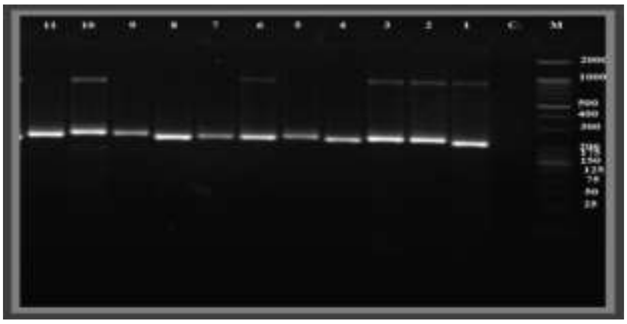
أجريت العديد من التجارب لتحسين ظروف تجربة PCR-SSR لـ 17 بادئ ، اربعة من البادئات لم تعطي اي نتيجة على الرغم من تكرارها اكثر من مرة عند استخدام مؤشرات SSR مع دنا الرز قد يكون بسبب غياب الموقع المكملة لتسلسلات تلك البادئات (RM315, RM302, RM336 وRM25519) تتفق مع دراسة (1)، بينما 13 بادئ أعطى تضاعف في مناطق مخصصة أنتج حزم مخصصة كما اختلاف في عدد الحزم و أوزانها الجزيئية باختلاف البادئ المستخدم ،ولغرض تسجيل البيانات وتحليله تم ترحيلها على هلام الاكاروز بعد إكمال برامج PCR أظهرت الصور حزم متماثلة كحزمة واحد او متباينة كحزمتين وقد تم تسجيل الملاحظات لكل مؤشر اعتمادا على حجم و نوع موقع الحزم (homozygote وhetrozygot)، كون مؤشرات SSR ذات سيادة مشتركة لذا فان متباينة الزيجة تظهر بحزمتين متخصصة لموقعين ويمكن تحديدها بسهوله (41) .

أوضحت النتائج ان الحجم الجزيئي للحزم الناتجة كانت متنوعة لجميع الاصناف الرز وقد تراوحت (115.423-1015.402)زوج قاعدي ، ويعود السبب في اختلاف عدد الحزم الناتجة من استخدام كل بادئ الى الاختلاف في عدد المواقع المكملة لذلك البادئ بين الاصناف المستخدمة في الدراسة تتفق هذه مع دراسة (4) اذا تراوحت الجحم الجزيئي بين (62- 737) زوج قاعدي عند استخدامة 30 مؤشر من نوع SSR ل 24 تركيب وراثي ،كما تتفق مع دراسة (15) . كما اوضحت النتائج اختلاف في إعداد الحزم الناتجة لكل بادئ بين الاصناف (جدول رقم 3). وان هذا الاختلاف بين الاصناف بسبب توزيع المواقع المكملة للبادئات لا يكون متساوياً بين الاصناف المدروسة وان أعلى عدد للحزم يدل على وفرة المواقع المكملة للبادئات مما يؤدي الى زيادة عدد الحزم الناتجة من ارتباط البادئات مع تلك المواقع وان معرفة هذه المواقع مهم في بناء الخرائط الوراثية ويساعد على تحديد صفات مهمة كتحمل الملوحة وتحمل الجفاف ومقاومة الإمراض (34)

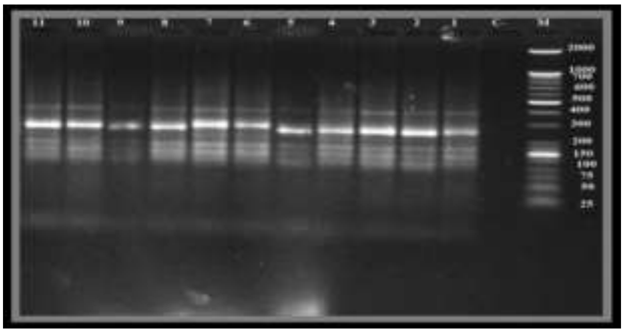
بلغت عدد الاليلات الكلية 64 اليل تم تحديدها في أحدا عشر صنف بمعدل 4.923 اليل لكل موقع ،سجل كل من البادئ RM10772 , RM201 اقل عدد اليلات بلغت 2 اليلات إما أعلى عدد اليلات بلغت 8 اليل سجلها البادئ RM3412 ،كما تراوحت عدد الاليلات في الصنف الواحد من 1-2 اليل يتفق مع (15) و (37)

كما وضحت النتائج عن وجود تباين الى حد كبير لجميع الموشرات SSR في محتوى تعدد الشكلي Polymorphism information content (PIC) الذي يمثل انعكاس لتنوع الاليلي والتكرار الاليلي بين الأصناف حيث تتراوح القيمة بين (0.0830 -0.8434) اذا سجل البادئ RM3412 اعلى قيمة محتوى تعدد الشكلي إما اقل قيمة محتوى تعدد شكلي سجله البادئ RM10772. في (جدول رقم 3) ، اغلب قيم محتوى تعدد الشكلي ل13 بادئ في هذه الدراسة سجلة قيم عالية مما يدل على كفائة البادئات في إيجاد التنوع الوراثي تتفق هذه الدراسة مع (1) و(32)، نلاحظ وجود علاقة طرديه بين محتوى تعدد الشكلي وعدد الاليلات لكل

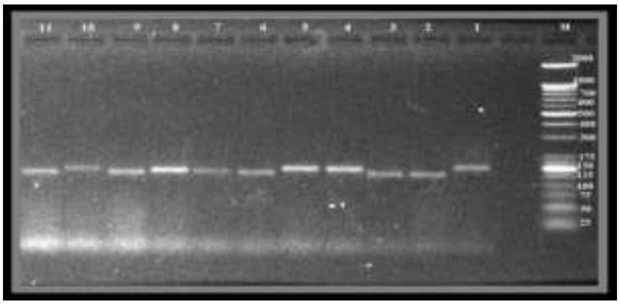
بادئ وعدد الحزم الكلية لكل بادئ (جدول رقم 3) ،إما قيم التنوع الوراثي تراوحت بين 0.0868 -0.8595 اذا سجل البادئ RM3412 أعلى قيم لتنوع الوراثي إما اقل تنوع وراثي سجله البادئ RM10772 (جدول رقم 3) تتفق هذا مع كل من (1) و (32) ، ان قيم المحتوى تعدد الشكلي والتنوع الوراثي والتباين في عدد الحزم الناتجة وكفائة البادئات المستعملة تعزى الى الاختلاف بالتسلسل النيوكليوتيدي في المادة الوراثية للنبات وقد يكون سبب هذا الاختلافات هو ادخال زوج من النيوكليوتيدات Insertions او استبدلSubstitutions او حذف Deletions بسبب حدوث طفرة معينة (5) . سجل كل من البادئ RM3412 أعلى قيم لمتباينة الزيجة Heterozygot بلغت 1 (جدول رقم 3) .



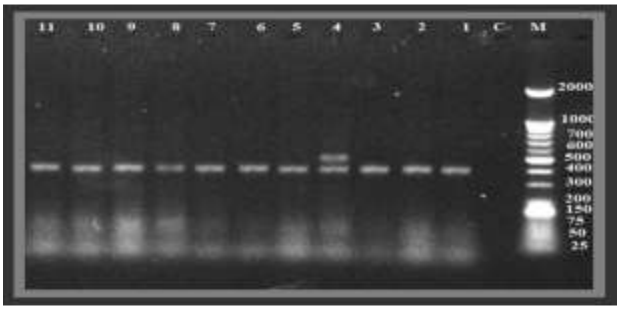
شكل 2: توضح نتائج البادئ RM8094 المرحلة على هلام الاكاروز بتركيز 1.5% لاصناف التالية 1-اباء ، 2-عنبرالبركة ، 3- فرات1، 4-غدير ، 5- برنامج4 ،6-ياسمين ،7-بحوث1 ،8- عنبر33، 9- دجلة 10مشخاب2 ،11 –مشخاب1، -Mالدليل الحجمي القياسي 2000 bp -25 bp.



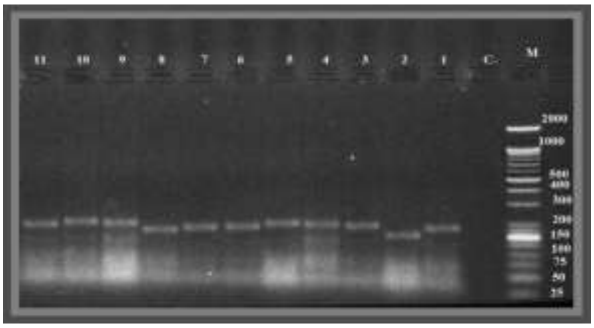
شكل 3: توضح نتائج البادئ RM3412 المرحلة على هلام الاكاروز بتركيز 1.5% التراكيب الوراثية التالية 1-اباء ، 2-عنبرالبركة ، 3- فرات1، 4-غدير ، 5- برنامج4 ،6 ياسمين ،7-بحوث1 ،8- عنبر33، 9- دجلة 10مشخاب2 ،11 – مشخاب1، M الدليل الحجمي القياسي 2000 bp -25 bp.



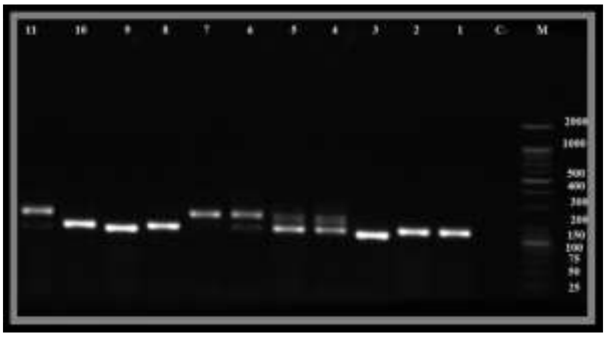
شكل 4: توضح نتائج البادئ RM 25 المرحلة على هلام الاكاروز بتركيز 1.5% التراكيب الوراثية التالية 1-اباء ، 2-عنبرالبركة ، 3- فرات1، 4-غدير ، 5- برنامج4 ،6-ياسمين ،7-بحوث1 ،8- عنبر33، 9- دجلة 10مشخاب2 ،11 –مشخاب1، M الدليل الحجمي القياسي .2000 bp –25 bp



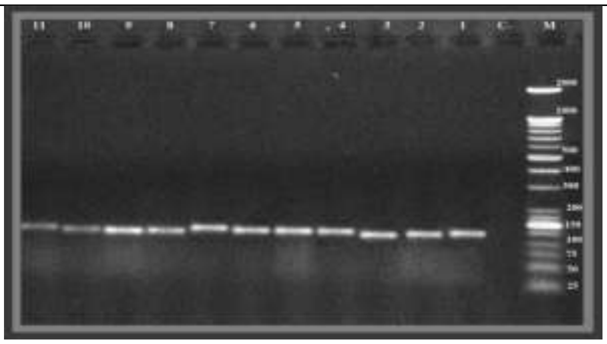
شكل5: توضح نتائج البادئ RM10772 المرحلة على هلام الاكاروز بتركيز 1.5% التراكيب الوراثية التالية 1-اباء ، 2-عنبرالبركة ، 3- فرات1، 4-غدير ، 5- برنامج4 ،6-ياسمين ،7-بحوث1 ،8- عنبر33، 9- دجلة 10مشخاب2 ،11 –مشخاب1، M الدليل الحجمي القياسي .2000 bp –25 bp



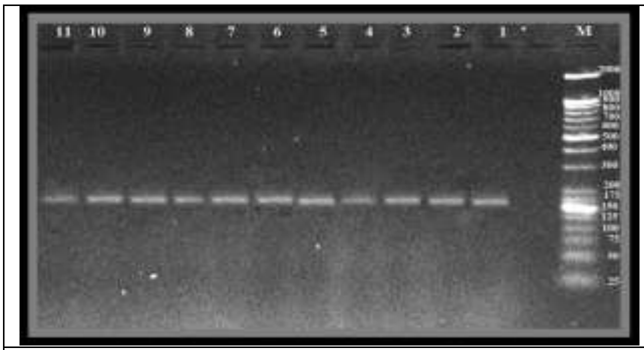
شكل 6: توضح نتائج البادئ RM296 المرحلة على هلام الاكاروز بتركيز 1.5% التراكيب الوراثية التالية 1-اباء ، 2-عنبرالبركة ، 3- فرات1، 4-غدير ، 5- برنامج4 ،6- ياسمين ،7-بحوث1 ،8- عنبر33، 9- دجلة 10مشخاب2 ،11 -مشخاب1، M الدليل الحجمي القياسي 2000 bp -25 bp.



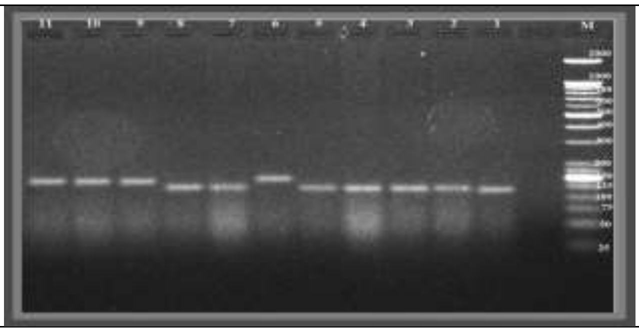
شكل7: توضح نتائج البادئ RM585 المرحلة على هلام الاكاروز بتركيز 1.5% التراكيب الوراثية التالية 1-اباء ، 2-عنبرالبركة ، 3- فرات1، 4-غدير ، 5- برنامج4 ،6- ياسمين ،7-بحوث1 ،8- عنبر33، 9- دجلة 10مشخاب2 ،11 -مشخاب1، M الدليل الحجمي القياسي 2000 bp -25 bp.



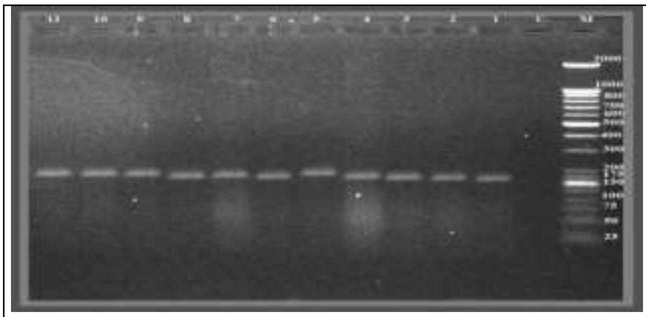
شكل8: توضح نتائج البادئ RM510 المرحلة على هلام الاكاروز بتركيز 1.5% التراكيب الوراثية التالية 1-اباء ، 2-عنبرالبركة ، 3- فرات1، 4-غدير ، 5- برنامج 4 ،6- ياسمين ،7-بحوث1 ،8- عنبر33، 9- دجلة 10مشخاب2 ،11 -مشخاب1، M الدليل الحجمي القياسي 2000 bp -25 bp.



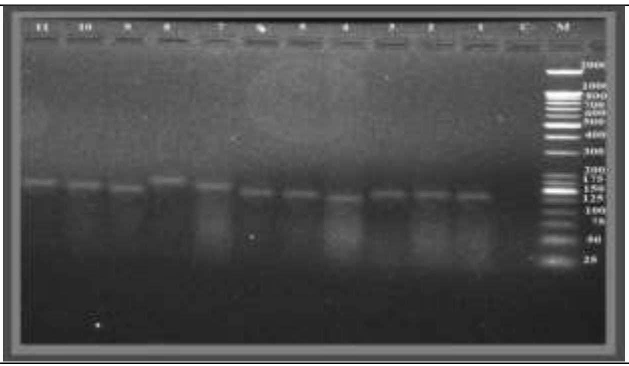
شكل 9: توضح نتائج البادئ RM201 المرحلة على هلام الاكاروز بتركيز 1.5% التراكيب الوراثية التالية 1-اباء ، 2-عنبرالبركة ، 3- فرات1، 4-غدير ، 5- برنامج4 ،6- ياسمين ،7-بحوث1 ،8- عنبر33، 9- دجلة 10مشخاب2 ،11 – مشخاب1، M الدليل الحجمي القياسي 2000 bp -25 bp.



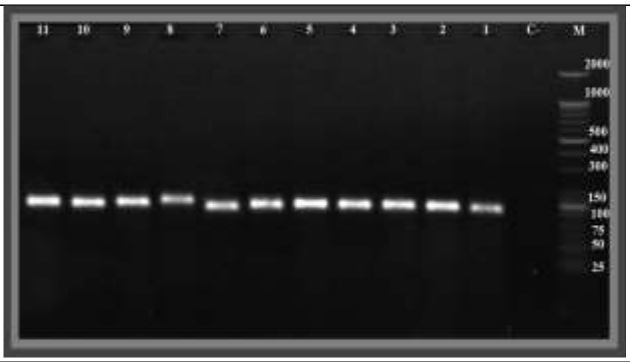
شكل 10: توضح نتائج البادئ RM212 المرحلة على هلام الاكاروز بتركيز 1.5% التراكيب الوراثية التالية 1-اباء ، 2-عنبرالبركة ، 3- فرات1، 4-غدير ، 5- برنامج4 ،6- ياسمين ،7-بحوث1 ،8- عنبر33، 9- دجلة 10مشخاب2 ،11 -مشخاب1، M الدليل الحجمي القياسي 25 bp- 2000 bp.



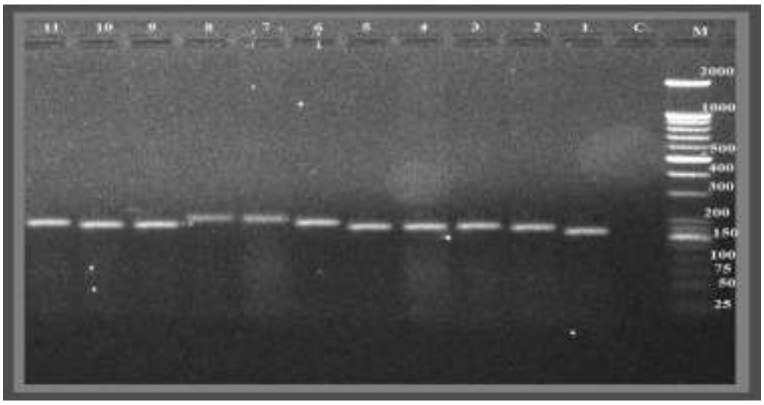
شكل 11: توضح نتائج البادئ RM3825 المرحلة على هلام الاكاروز بتركيز 1.5% التراكيب الوراثية التالية 1-اباء ، 2-عنبرالبركة ، 3- فرات1، 4-غدير ، 5- برنامج4 ،6- ياسمين ،7-بحوث1 ،8- عنبر33، 9- دجلة 10مشخاب2 ،11 – مشخاب1، M الدليل الحجمي القياسي 25 bp- 2000 bp.



شكل 12: توضح نتائج البادئRM 8085 المرحلة على هلام الاكاروز بتركيز 1.5% التراكيب الوراثية التالية 1-اباء ، 2-عنبرالبركة ، 3- فرات1، 4-غدير ، 5- برنامج 4 ،6- ياسمين ،7-بحوث1 ،8- عنبر33، 9- دجلة 10مشخاب2 ،11 -مشخاب1، M الدليل الحجمي القياسي 25 bp- 2000 bp.



شكل 13: توضح نتائج البادئRM 278 المرحلة على هلام الاكاروز بتركيز 1.5% التراكيب الوراثية التالية 1-اباء ، 2-عنبرالبركة ، 3- فرات1، 4-غدير ، 5- برنامج 4 ،6- ياسمين ،7-بحوث1 ،8- عنبر33، 9- دجلة 10مشخاب2 ،11 -مشخاب1، M الدليل الحجمي القياسي 25 bp- 2000 bp.



شكل 14: توضح نتائج البادئ259 RM المرحلة على هلام الاكاروز بتركيز 1.5% التراكيب الوراثية التالية 1-اباء ، 2-عنبرالبركة ، 3- فرات1، 4-غدير ، 5- برنامج4 ،6- ياسمين ،7-بحوث1 ،8- عنبر33، 9- دجلة 10مشخاب2 ،11 -مشخاب1، M الدليل الحجمي القياسي 25 bp- 2000 bp.

جدول 3: يوضح ملخص نتائج تحليل التنوع الوراثي لأحدى عشر صنفا من الرز باستخدام 13 البادئات ضمن تقانة SSR يتضمن اسم البادئ، عدد الحزم المتضاعفة، حجم الحزم المتضاعفة ، الفرق بين الحجم الجزيئ ، عدد الاليلات ، أعلى تكرار لاليل ، قيم التنوع الوراثي ، متباينة الزيجة heterozygosity ومحتوى التعدد الشكلي.

PIC	Heterozygosity	Gene Diversity	Major . Allele . Frquency	Allele No	Size range (bp)	No. of amplified bands	Marker	No.
0.7935	0.3636	0.8182	0.2727	7	1015.402 -209	16	**RM8094**	1
0.8434	0.9091	0.8595	0.1818	8	391.979 -260.76	20	**RM3412**	2
0.5721	0.0000	0.6446	0.4545	3	152.639 -129.002	11	**RM25**	3
0.0830	0.0909	0.0868	0.9545	2	500- 422.697	12	**RM10772**	4
0.7469	0.0000	0.7769	0.3636	6	249.245-157.634	11	**RM296**	5
0.5718	0.0000	0.6405	0.4545	4	150.556 -122	11	**RM510**	6
0.6221	0.0000	0.6667	0.5000	5	285.387-175.312	15	**RM585**	7
0.3729	0.0000	0.4959	0.5455	2	269.184-205.321	11	**RM201**	8
0.6491	0.0000	0.6942	0.4545	5	158-140.522	11	**RM212**	9
0.7196	0.0000	0.7603	0.2727	5	150-115.423	11	**RM3825**	10
0.8043	0.0000	0.8264	0.2727	7	197.601 -159.791	11	**RM8085**	11
0.4762	0.0000	0.5620	0.5455	3	168.979-120.847	11	**RM278**	12
0.8229	0.0000	0.8430	0.1818	7	159.27-141	11	**RM259**	13
0.6214	0.1049	0.6673	0.4196	4.9231		12.46	**Mean**	

تباينت البادئات فيما بينها بإعطاء بصمة وراثية مميزة بين الأصناف فقد تمكن البادئ (RM3412 و8085 RM) من إعطاء بصمة وراثية مميزة لثلاثة الأصناف في هذا الدراسة ، كما تمكن البادئRM296 ،RM212 RM259 من إعطاء بصمة وراثية مميزة لاثنين من أصناف جدول رقم (4). توضح هذا المعلومات إمكانية تقنيةPCR-SSR في قدرتها على الكشف عن العلاقة الوراثية بين الأصناف ويمكن ان يعزى الاختلاف بين الأصناف الى الاختلاف القاعدة الوراثية كذلك يمكن ان يعطي إعداد الاليلات وقيم التنوع الوراثي فكرة عن القاعدة الوراثية الواسعة بين الأصناف الرز كما ان متباينة الزيجة تعطي قياس جيد للبعد الوراثي وموقع تعدد الاشكال ويعتبر متباينة الزيجة Heterozygot مقياس واسع النطاق على التنوع الوراثي . ان قدرة مؤشرات SSR في أعطاء اكبر عدد ممكن من الاليلات لكل موقع يساعد في معرفة تعدد الإشكال polymorphism التي تعد من الأمور المهمة لمربي النبات ، يتفق مع دراسة كل من(9) ، (10) ،(40) و في اهمية مؤشرات SSR و استخدامه على نطاق واسع في دراسة علاقة النشؤ والتطور وتحليل التنوع بين التراكيب الوراثية للرز ورسم الخرائط وتميز الصفات الكمية المهمة (46).

جدول 4: يوضح نتائج البادئات في أعطاء البصمة الوراثية المميزة لإحدى عشر صنفا من

ت	اسم البادئ	البصمة الوراثية للأصناف المميزة	عدد الأصناف المميزة ببصمة وراثية
1	RM8094	فرات1	1
2	RM3412	اباء ، غدير ، بحوث1	3
3	RM10772	غدير	1
4	RM296	عنبر البركة ، بحوث1	2
5	RM212	عبر البركة ، ياسمين	2
6	RM3825	برنامج4	1
7	RM8085	برنامج 4،عنبر33،مشخاب2	3
8	RM278	عنبر33	1
9	RM259	اباء ،مشخاب1	2

العلاقة الوراثية بين التراكيب الوراثية Genetic Relationships

أوضحت النتائج في الجدول رقم (5) ان اقل بعد وراثية بلغ 0.3269 بين الصنفين عنبر البركة و فرات1 وهذا يعني وجود تشابه بدرجة عالية بين الصنفين عند استخدام تقنية SSR ، بينما أعلى بعد وراثية بلغ 0.8846 بين كل من صنف (غدير و مشخاب2) ، وهذا يدل على اقل التشابه بين هذا التراكيب الوراثية بسبب اختلاف الأصل جدول رقم (1) إن نسبة التشابه الوراثي لجميع الأصناف تراوحت بين (0.1154 – 0.6731) اعتماد على قيم البعد الوراثية التي تراوحت بين (0.8846 – 0.3269)التي تشير إلى نسبة تنوع الوراثي كبير تراوحت بين (88% –32%) وهذا يكشف عن تباين وراثي عالي بين الأصناف مما يجعلها

مصادر وراثية غنية. اذا يمكن انتخاب الأصناف التي سجلت أعلى بعد وراثي لكالأبوين في برامج التربية المستقبلية لتحسين أصناف الرز ، تتفق مع دراسة (15) و(32) (37).

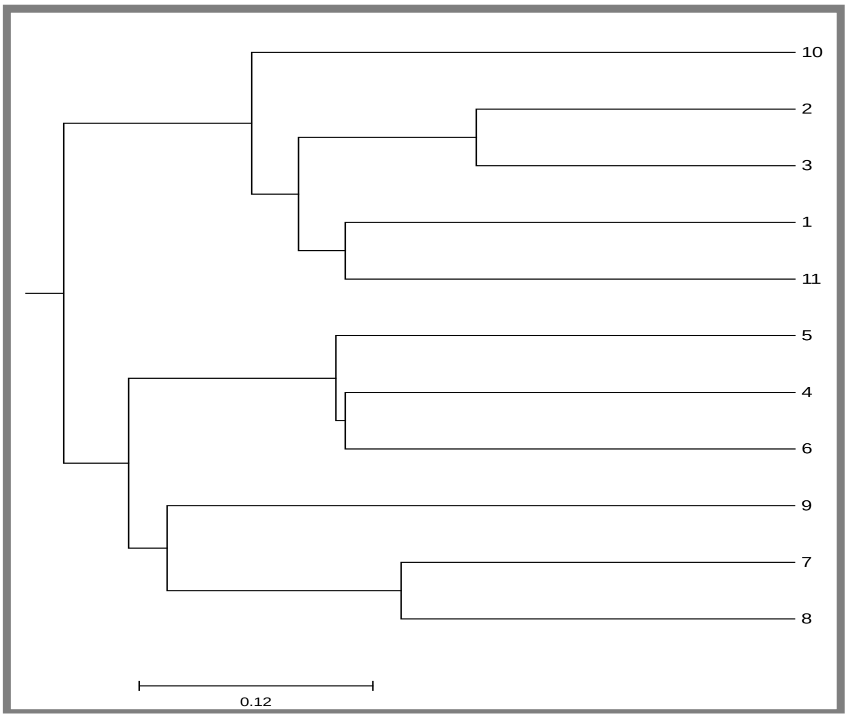
جدول 5: يوضح قيم البعد الوراثي لاصناف والتراكيب الوراثية قيد الدراسة باستخدام تحليل مؤشرات SSR (1-اباء،2-عنبر البركة ،3- فرات1 ، 4- غدير ،5-برنامج4، 6- ياسمين ، 7- بحوث1، 8-عنبر33 ، 9- دجلة ، 10 مشخاب 2، 11- مشخاب1)

OTU	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1	0.0000										
2	0.5577	0.0000									
3	0.5577	0.3269	0.0000								
4	0.7692	0.8462	0.8462	0.0000							
5	0.6731	0.6731	0.7500	0.4808	0.0000						
6	0.7885	0.8269	0.7500	0.4615	0.4615	0.0000					
7	0.8462	0.7692	0.7692	0.7692	0.7115	0.6538	0.0000				
8	0.6731	0.6731	0.7500	0.7115	0.6154	0.5385	0.4038	0.0000			
9	0.7308	0.6538	0.6538	0.6731	0.7692	0.7115	0.5962	0.6923	0.0000		
10	0.6154	0.5000	0.5385	0.8846	0.6346	0.7115	0.8077	0.7115	0.7885	0.0000	
11	0.4615	0.4615	0.4615	0.8269	0.7115	0.8077	0.7500	0.6346	0.8077	0.5769	0.0000

شجرة العلاقة الوراثي :Relationship genetic Tree

ان التحليل التجمعي Cluster لبناء الشجرة الوراثية Dendrograme بطريقة UPGMA يعتمد على معامل البعد الوراثي والتكرار الاليلي .في هذا الدراسة تم رسم الشجرة الوراثية لاحد عشر صنف من الرز باستخدام مؤشرات SSR اذا كان عدد البادئات 13 بادئ بينت نتائج التحليل التجميعي عن مجموعتين رئيسية (Main Cluster) عند مستوى تشابه مقداره 0.12. المجموعة الرئيسية الأولى انقسمت الى ثلاث مجاميع ثانوية Sub-Cluster ضمت الاولى منها صنف مشخاب2 اما الثانية ضمت كل من عنبرالبركة فرات1 إذا كانت نسبة التشابه بينهما 0.6731 . ضمت الثالثة صنف اباء ومشخاب 1 نسبة التشابه بينهما بلغت 0.5385 . اما المجموعة الرئيسية الثانية ضمت مجموعتين ثانوية ضمت الاولى ثلاث اصناف صنف غدير ،برنامج4و ياسمين اما المجموعة الثانية ضمت بحوث1 ،عنبر33 و دجلة). نلاحظ إن تحليل ألتجمعي Clusterالمعتمدة على بيانات SSR لأصناف الرز في هذه الدراسة تشير الى وجود التشابه الوراثي بين أصناف من أسلاف مختلفة في الموقع نفسه قد يكون بسبب تكيف وراثياً مع الظروف البيئية السائدة في ذلك الموقع، لذى فان المادة الوراثية تشابه بعض الشئ مما أدى الى انعكاسها في عدد الحزم المشتركة بينها. وقد يكون لها قاعدة وراثية مشتركة وبالتالي من المحتمل ان تدفق الجينات بين توزيعا جغرافية مختلفة تتفق مع (15).

ولم تتفق مع الدراسة (38) كما أثبتت الدراسة الحالية كفاءة مؤشر SSR في الكشف عن التنوع الوراثي في الرز (39)، لذا استطاع مؤشرات SSR من تحقيق أهداف هذا الدراسة هو إيجاد العلاقة الوراثية بين أصناف الرز واظهر الاختلاف الوراثي لكل صنف. من خلال إيجاد اكبر عدد من التباينات الوراثية ، وقدرته في بناء شجرة العلاقة الوراثية مما يدل على أهمية هذه المؤشرات تحديد العلاقة الوراثية بين أصناف الرز تساعد على فتح آفاقاً واسعة في برامج التربية والانتخاب المعتمد على المؤشرات الوراثية (Marker–assisted selection) ، و البحث عن جين المقاومة وبناء الخريطة الوراثية في (3) و (9) .



الشكل 15: يوضح شجرة العلاقة الوراثية بين اصناف الرز(1–اباء،2–عنبر البركة ،3– فرات1 ، 4– غدير ،5–برنامج4، 6– ياسمين ، 7– بحوث1 ،8–عنبر33 ، 9– دجلة ، 10 مشخاب 2، 11– مشخاب1)

المصادر

1- **Ahasanul H.; Shamsun N.; Begum and Lutfu L .(2014)** Genetic diversity assessment of rice (*oryza sativa* L.) germplasm using ssr markers. J. Res. Agric.. 1,(1): 37-46.

2- **Arundathi N.; Sangram M.; Rudraksh S.P.;Lambodar B.; Anand P.; Sarat S. (2010)** Flanking microsatellite markers for breeding varieties against Asian rice gall midge. Trop. Plant Biol. 3: 219-226.

3- **Babu B.K.; Meena V.; Agarwal V.; Agrawal P.K.(2014)**Population structure and genetic diversity analysis of Indian and exotic rice (*Oryza*

sativa L.) accessions using SSR markers. J. Mol Biol Rep. ;41(7):4329–39.

4- **Berilus S. R.; Pattanayak A. and G. Ram. (2013)** Analysis of Genetic Variability in Rice Cultivars of Arunachal Pradesh (India) Using Microsatellite Marker, African J. Biotechnology,. 12, (8), pp. 798-810.

5- **Bharathkumar S.; Jitendra K.; Pragnya, P.J.; Sai Krishna R.; Chaitanya, K.G. and Reddy J.N..(2014)** A molecular survey in rice germplasms for multiple abiotic stress tolerance to changing climate using microsatelite (SSR) markers.J. Eco. Env. & Cons. 20 (Suppl.) :pp. S277-S282.

6- **Brondani, C.; Rangel N.; Brondani V. and Ferreira E. (2002)** QTL mapping and introgression of yield-related traits from Oryza glumaepatula to cultivated rice (*Oryza sativa* L) using microsatellite markers. Theor. Appl. Genet., 104: 1192-1203.

7- **Chang C.S.U.; ZHAI H.Q.; WANG S.N .; WAN J. M.(2006)**SSR Mapping of Brown Planthopper Resistance Gene Bph9 in Kaharamana, an Indica Rice (*Oryza sativa* L.). J. Acata GeneticaSinica, , 33 (3): 262-268.

8- **Channamallikarjuna V.; Sonah H.; Prasad M.; Rao G.; Chand S.;Upreti H.; Singh N.; Sharma T.R. (2010)** Identification of major quantitative trait lociqSBR11-1for sheath blight resistance in rice. J. Molecular Breeding .25: 155 – 166.

9- **Das B.; Sengupta S.; Parida S.; Roy B.; Ghosh M.; Prasad M. (2013)** Genetic diversity and population structure of rice landraces from Eastern and North Eastern States of India. J. BMC Genet.;14(1):71-76.

10- **Emanuelli F.; Lorenzi S.; Grzeskowiak L.; Catalano V.; Stefanini M.; Troggio M.; Myles S.; Martinez Z. J.; Zyprian E.; Moreira F.; Grando M.S. (2013)** Genetic diversity and population structure assessed by SSR and SNP markers in a large germplasm collection of grape.J. BMC Plant Biology 13:39.

11- **Guo, Y.; Cheng B. And Hong D. (2010)** Construction Of Ssr Linkage Map And Analysis Of Qtls For Rolled Leaf In Japonica Rice. J. Rice Science, 17: 28-34.

12- **Hasoon, W. H. (2014)** The role of some physical factors on the germination and growth and yield indicators in the pepper sweet. Coll. Of Agric .j. At Uni. Of Baghdad. PP:125.

13- **Himabindu K.; Suneetha K. ; Arun S.;Jagadish B.(2010)** A new rice gall midge resistance gene in the breeding line CR57-MR1523, mapping with flanking markers and development of NILs. J.Euphytica. 174(2):179-187 .

14- **Islam M. R.; Salam M. A. ; Hassan L.;Collard B. C. Y.; Singh R. K. and Gregorio G. B. (2011)** QTL mapping for salinity tolerance at seedling stage in rice . J. Food Agric.. 23 (2): 137-146.

15- **Israt N.; Mohiuddin A.K.M.; Shahanaz S. and Jannatul F.(2014)** Diversity analysis of indica rice accessions (*Oryza sativa* L.) using morphological and SSR markers .J.Annals of Biological Research ,5 (11):20-31.

16- **Jairin J.; Phengrat K.; Teangdeerith S.; Vanavichit A.; Toojinda T. (2007).**

17- **Jiangbo Z.; Aiqing Y.; Zhujun M.; Lili Z. and Guangcun H.(2012)** Association analysis of important agronomic traits in japonica rice germplasm . J. Biotechnology 11(12), pp. 2957-2970.

18- **Kanbar A.; Shashidhar H.E. (2011)** Participatory selection assisted by DNA markers for enhanced drought resistance and productivity in rice (*Oryza sativa*, L.). Euphytica, 178(1): 137-150.

19- **Li J.; Xie Y.; Dai A.; Liu L.; Li Z. (2009)** Root and shoot traits responses to phosphorus deficiency and QTL analysis at seedling stage using introgression lines of rice. J Genet Genomics. 2;36:173–183.

20- **Li W.; Wu J.; Weng S.; Zhang D.; Zhang Y. and Shi C. (2010)** Characterization and fine mapping of the glabrous leaf and hull mutants (gl1) in rice (*Oryza sativa* L.). Plant cell reports, 29: 617-627.

21- **Liu K.; Muse S.V.; Bioin f. (2005)** 21: 2128–2129.

22- **Mamunur M.; Rahman R. M. G.; Hossain M. A.; Iftekharuddaula K. M.; And Hasegawa H. (2012)** Molecular Characterization And Genetic Diversity Analysis Of Rice (*Oryza Sativa* L.)Using Ssr Markers. J.Crop Improvement, 26:244–257.

23- **Md F. R.;Mizan M. R. ;Jyoti H. ; Sayda R. ;Shamsunnahar B. and Mirza M. I.(2015)** Genetic diversity and SSR marker assisted salt screening of rice (Oryza sativa L.).J. Biosci Bioeng Commun; 1: 29-37.

24- **Mehede H.R. ; Lutful H. ; Mirza M. I. ; Arif H. ; Andmd J.A. (2014)** Evaluation Of Rice Genotypes Under Salt Stress At The Seedling And Reproductive Stages Using Phenotypic And Molecular Markers. Pak. J. Bot., 46(2): 423-432.

25- **Mujaju, C.; Sehic J. and Nybom H.(2013)** Assessment of EST-SSR Markers for evaluating genetic diversity in watermelon accessions from Zimbabwe . American J. Plant Sciences. 4: 1448-1456.

26- **Myint K.K; Fujita D.; Matsumura M.; Sonoda T.; Yoshimura A.; Yasui H. (2012)** Mapping and pyramiding of two majorgenes for resistance to the brown planthopper (Nilaparvata lugens [Stål]) in the rice cultivar ADR52. J. Theor. Appl. Genet. 124: 495-504.

27- **Nguyen T. P. and Nguyen T.L..(2004)** Marker Assisted Selection In Rice Breeding For Bacterial Leaf Blight.J. Omonrice 12: 19-26.

28- **Pervaiz Z. H.; Tehrim S.; Rabbani M.A.; Masood M.S. and Malik S.A.(2011)** .“Diversity in Major Seed Storage Pro-teins of Rice Landraces of Pakistan,” Pakistan Journal of Botany, Vol. 43, pp. 1607-1612.

29- **Qiu Y.; Guo J.; Jing S.; Zhu L.; He G. (2010)** High-resolution mapping of the brown planthopper resistance gene Bph6 in rice and characterizing its resistance in the 9311 and Nipponbare near isogenic backgrounds. J. Theor. Appl. Genet. 121:1601-1611

30- **Qu Y.; Mu P., Zhang H.; Chen C.; Gao Y.; Tian Y.; Wen F.; Li Z. (2008)** Mapping QTLs of root morphological traits at different growth stages in rice. Genetica, 133:187–200.

31- **Rajendrakumar, P.; Biswal, A. K.; Balachandran, S. M.; Srinivasarao, K. and Sundaram, R. M. (2007)** Simple sequence repeats in organellar genomes of rice: frequency and distribution in genic and intergenic regions.j. Bioinformatics, 23:1–4.

32- **Sadia Matin, M.; Ashrafuzzaman, Md.; Monirul I.; Saif U.; Sikdar, N..(2012)**Molecular marker based (SSR) genetic diversity analysis in deep water rice germplasms of Bangladesh. J. Biosciences. 2, : 10(2), p. 64-72.

33- **Sajib A.M.; Hossain M.M.; Mosnaz A.T.; Hosneara H.; Islam M.M.;Ali M.S.; Prodhan S.H. (2012)**SSR marker-based molecular characterization and genetic diversity analysis of aromatic. . J BioSci. Biotech., 1(2): 107-116.

34- **Salgotra R. K.; Gupta B. B.; Javaid A. B.; Sandeep S.(2015**)Genetic Diversity and Population Structure of Basmati Rice (*Oryza sativa* L.) Germplasm Collected from North Western Himalayas Using Trait Linked SSR Markers. J.pone 1(8).1-19.

35- **Salunkhe A.S.; Poornima R.; Prince K.S.; Kanagaraj P.;Sheeba J.A.;Amudha K.; Suji K.K.; Senthil A.; Babu R.C. (2011)** Fine mapping QTL for drought tolerance traits in rice (*Oryza sativa*, L.) using bulk segregant analysis .j. Mol. Biotechnology, 49(1): 90-95.

36- **Sambrook, J. and Russell, D. W. (2001)** In vitro application of DNA by the polymerase chain Reaction, in molecular cloning: Chapter 8: 691-733. A laboratory manual. 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

37- **Shahid M. S.; Shahzad A.N.(2013)** genetic diversity in basmati and non-basmati rice varieties based on microsatellite markers. J. Bot., 45(S1): 423-431.

38- **Singh A.K.; Rohini N. and Singh, P.K.(2015)**Identification Of Bacterial Leaf Blight Resistance Genes In Rice (Oryza Sativa L.). I.J.S.N.6 (2) 2015: 283-287.

39- **Singh, V. K.; Upadhyay, P.; Sinha, P., Mall, A. K. and Jaiswal, S. K.(2011)** Determination of genetic relationships among elite thermosensitive genic Male sterile lines (tgms) of rice (Oryza sativa l.) employing morphological and simple sequence repeat (SSR) markers. J. of Genet. 90(1): 11-19.

40- **Sohrabi, M.; Rafii,M.Y.; Hanafi,M.M. ; Akmar,A.S.N. ; Latif M.A. (2012)** The Scientific World J., , 12: 1-9.

41- **Sun L.; Su C.; Wang C.;Zai H.; Wan J. (2005)** Mapping of a major resistance gene to brown planthopper in the rice cultivar Rathu Heenati. Breed. Sci. 55:391-396.

42- **Sundaram R.M. (2007)** Fine mapping of rice gall midge resistance genes Gm1 and Gm2 and validation of the linked markers. PhD thesis submitted to University of Hyderabad, Hyderabad, pp.181.

43- **Swamy B.; Vikram P.; Dixit S.; Ahmed H.; Kumar A. (2011)** Meta-analysis of grain yield QTL identified during agricultural drought in grasses showed consensus. BMC Genomics, 12:319.

44- **Toufique H. K.; Fatematuz Z. E. ; Mehede H. R. ;Khondoker M. N. and Mahbubur R.(2015)** Screening of Rice Varieties for Bacterial Leaf Blight Resistance by Using SSR Markers. J. Bioscience and Agriculture Research : 09., Vol. 03 (01): 45-58.

45- **Vikram P.; Pandit A.; Singh A.; Singh S.;Kumar A.; Singh N.K . (2010)** Development and validation of SSR markers for a robust drought tolerant QTL in rice. 3 rd International Rice Congress 2010, 8-(10). p43-32.

46- **Wang C.S.; Wang A.Z.; Lin D.G. (2013)**The application of mutants in breeding disease resistance in rice. Paper presented at the Special issue or the symposium on important crop pathogen detection and management, Taichung .

47- **Wang Z.; Cheng J.; Chen Z.; Huang J.; Bao Y.; Wang J. (2012)** Identification of QTLs with main, epistatic and QTL× environment interaction effects for salt tolerance in rice seedlings under different salinity conditions. J. Theor Appl Genet.;125(4):807–815.

48- **Wu, M.; Jia, X.; Tian, L. and Lv, B. (2010)** Rapid and reliable purity identification of F_1 hybrids of maize (*Zea may* L.) using SSR markers. Molecular Plant Breeding, 4(3): 381-384.

49- **Xu Q.; Chen,H. ; Wang, H.y. ;Yu, X.p.; Yuan, Y.p.; Wang, Y.; Feng, S.x. ;Tang, X.h. (2012)**Integrative Agriculture, 11(10): 1567-1573.

50- **Yadav S.; Anuradha G.; Kumar R.R.; Vemireddy L.R.; Sudhakar R.; Donempudi K. (2015)** Identification of QTLs and possible

candidate genes conferring sheath blight resistance in rice (Oryza sativa L.). J. SpringerPlus 4: 175.

51- **Yang H.Y.; Ren, X.;Weng Q.M; Zhu L.L.; He G.C. (2002)** Molecular mapping and genetic analysis of a rice brown planthopper (Nilarparvata lugens Stål) resistance gene.J. Hereditas 136:39-43.

52- **Zhang F.; Jiang Y. Z.; Yu S. B.; Ali J.; Paterson A .H.; Khush G. S.; Xu J. L.; Gao Y. M.; Fu B. Y.; Lafitte R.; Li Z. K. (2013)** Three genetic systems controlling growth, development and productivity of rice (Oryza sativa L.): a reevaluation of the ‘Green Revolution. Theoretical and Applied Genetics, 126, 1011-1024.

53- **Zuo S.M.;Zhang Y.F.; Chen Z.X.; Chen X.J.; Pan X.B. (2010)** Current progress on genetics and breeding in resistance to rice sheath blight. Scientia Sin Vitae 1023–40:1014.