

ارزیابی فنوتیپی و مولکولی عطر در ژنوتیپ‌های برنج ایرانی Phenotypic and molecular evaluation of fragrance in Iranian rice genotypes

نوش آفرین کرمی^۱، علی اعلمی^۲، حبیب اله سمیع زاده لاهیجی^۳، مهرزاد اله قلی پور^۴ و
بابک ربیعی^۵

چکیده

کرمی، ن.، ع. اعلمی، ح. سمیع زاده لاهیجی، م. اله قلی پور و ب. ربیعی. ۱۳۹۳. ارزیابی فنوتیپی و مولکولی عطر در ژنوتیپ‌های برنج ایرانی. مجله علوم زراعی ایران. ۱۶(۱): ۱۲-۲۴.

یکی از عوامل مهم تعیین کننده کیفیت دانه برنج، ویژگی عطر است. در این آزمایش صفت عطر در ۲۹ رقم برنج ایرانی با استفاده از آزمون کیفی بر اساس بویایی پس از تاثیر هیدروکسید پتاسیم ۱/۷ درصد روی برگ و دانه و روش‌های مولکولی مبتنی بر نشانگرهای اختصاصی در سال ۱۳۹۰ در موسسه تحقیقات برنج کشور در رشت مورد بررسی قرار گرفت. آزمون کیفی سنجش عطر، ارقام برنج را به دو گروه معطر و غیرعطری تقسیم نمود، به طوریکه ۱۳ رقم عطری و ۱۶ رقم غیرعطری تشخیص داده شدند. ارقام شاخص معطر شامل دمسیاه، علی کاظمی، فجر، بینام، هاشمی و ارقام شاخص غیرعطری شامل نعمت، خزر، ندا، سفیدرود و دشت بودند. نتایج ارزیابی مولکولی بر اساس نشانگر SSR4463-L413 و نشانگر تکثیر اختصاصی آلل (ASA) نشان داد که نشانگر SSR4463-L413 در ارقام معطر و غیرعطری چند شکل بود و از ارقام برنج مورد ارزیابی ۱۳ رقم معطر و سایر ارقام غیرعطری تشخیص داده شدند که این موضوع با نتایج سنجش کیفی عطر مطابقت داشت. بر اساس نتایج نشانگر ASA نیز ۱۳ رقم معطر و سایر ارقام غیرعطری شناسایی شدند. نتایج این تحقیق نشان داد که نشانگر SSR4463-L413 با دقت بالایی می‌تواند ارقام برنج معطر و غیرعطری ایرانی را متمایز نماید و بنابراین می‌تواند از آن به عنوان یک نشانگر کارآمد برای ارزیابی و غربالگری سریع ژنوتیپ‌ها در جمعیت مورد استفاده قرار گیرد. نتایج همچنین نشان داد که نشانگر ASA علاوه بر توانایی در پیش‌بینی ارقام معطر و غیرعطری هموزیگوت می‌تواند ارقام غیرعطری هتروزیگوت برنج را نیز شناسایی کند، بنابراین می‌تواند در جمعیت‌های در حال تفرق برای صفت عطر به عنوان یک نشانگر همبازر توصیه شود.

واژه‌های کلیدی: ۲-استیل-۱-پیروئین، آلل اختصاصی، بتائین آلدهید دهیدروژناز، برنج و نشانگر اختصاصی.

این مقاله مستخرج از پایان‌نامه کارشناسی ارشد نگارنده اول می‌باشد

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۰۱/۲۳ تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۰۳/۱۳

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد دانشکده علوم کشاورزی دانشگاه گیلان

۲- استادیار دانشکده کشاورزی دانشگاه گیلان. عضو انجمن علوم زراعت و اصلاح نباتات ایران (مکاتبه کننده) (پست الکترونیک: ali_aalami@yahoo.com)

۳- دانشیار دانشکده کشاورزی دانشگاه گیلان

۴- عضو هیأت علمی مؤسسه تحقیقات برنج کشور

۵- استاد دانشکده کشاورزی دانشگاه گیلان

مقدمه

در آب حرارت داده می‌شود و یا با محلول هیدروکسید پتاسیم یا یدید پتاسیم واکنش داده شده‌اند، عطری بودن و یا غیر عطری بودن ژنوتیپ‌ها را تشخیص می‌دهند. این روش به چند فرد خبره برای بوییدن نیاز دارد، فراتر از ماهیت ذهنی بودن، معایب عمده این روش سلیقه‌ای بودن و ضمناً اشباع شدن حس فرد آزمون کننده در طول زمان بر اثر بوییدن نمونه‌های زیاد است. در مقابل، روش بسیار حساس کروماتوگرافی گازی وجود دارد که قادر است مقادیر 2AP را به طور مستقیم و دقیق اندازه‌گیری نماید، اما این روش زمان‌بر و پرهزینه بوده و اگر در برنامه‌های به‌نژادی تعداد زیادی نمونه وجود داشته باشد، این روش قابل توصیه نیست. با توجه به محدودیت‌های روش‌های فوق، گزینش به کمک نشانگرها (Marker Assisted Selection: MAS) هم مزایای علمی بودن و هم سریع و دقیق بودن را دارد که امکان بررسی تعداد زیادی نمونه را بدور از تاثیر عوامل محیطی در برنامه‌های اصلاحی می‌دهد (Chen *et al.*, 2006; Sarhadi *et al.*, 2007; Jin *et al.*, 2010). بر این اساس امروزه نشانگرهای مولکولی SNP و SSRهای همبسته با این صفت (Lang and Buu, 2008; Jin *et al.*, 2003; Sarhadi *et al.*, 2007; Kibria *et al.*, 2008) و همچنین روش تکثیر اختصاصی آلل (Allele Specific Amplification; ASA) به‌طور گسترده‌ای در پروژه‌های تحقیقاتی برای تمایز ژنوتیپ‌های معطر و غیرعطری برنج به خصوص در جمعیت‌های در حال تفرق قابلیت استفاده دارند (Kibria *et al.*, 2008).

لانگ و بو (Lang and Buu, 2008) بیان کردند که نشانگرهای DNA مبتنی بر PCR برای انتخاب ژنوتیپ‌ها و یا انتقال دقیق و مؤثر ژن *fgR* به لاین‌های برتر اصلاح شده قابل استفاده هستند. آنها یک نشانگر RFLP، RG28 و نشانگر ریزماهواره RM223 شناسایی کرده و نشان دادند که پیوستگی قوی با ژن *fgR* در برنج دارند که می‌توانند بطور مؤثری برای انجام گزینش به کمک

برنج یک محصول مهم زراعی است که غذای اصلی بیش از نیمی از جمعیت جهان را تأمین می‌کند و نقش مهمی در امنیت غذایی دارد (Brar *et al.*, 2012). در برنامه‌های اصلاحی برنج، علاوه بر عملکرد دانه، کیفیت پخت و خوراک نیز از اهمیت قابل توجهی برخوردار است. کیفیت پخت بر اساس معیارهایی مانند اندازه دانه، شکل ظاهری، عطر، میزان آمیلوز و برخی خصوصیات دیگر سنجیده می‌شود که در این میان صفت عطر از ویژگی‌های مهم و مورد علاقه مصرف‌کنندگان این محصول در جهان می‌باشد. اساس بیوشیمیایی عطر در برنج، ترکیب ۲-استیل-۱-پیرولین (2-acetyl-1-pyrroline) است که میزان آن تحت تأثیر عوامل ژنتیکی و محیطی قرار می‌گیرد (Kibria *et al.*, 2008). تاکنون ۱۱۴ ترکیب فرار مختلف و مؤثر در عطر برنج تشخیص داده شده‌اند که از میان آن‌ها ۲-استیل-۱-پیرولین (2AP) به عنوان ترکیب اصلی عطر در بین محققین مورد قبول واقع شده است. وجود این ترکیب در ارقام باسامتی (هند و پاکستان) و جاسمین (تایلند) به عنوان ترکیب اصلی عطر مشخص شده است (Buttery *et al.*, 1983; Lorieux *et al.*, 1996; Chen *et al.*, 2006; Shi *et al.*, 2009; Sakthivel *et al.*, 2008). ترکیب 2AP در تمام قسمت‌های بوته برنج معطر به جز ریشه‌ها تشخیص داده شده است (Buttery *et al.*, 1983; Chen *et al.*, 2006) و سطح آن در قسمت‌های هوایی بوته نسبت به دانه‌های تبدیل شده بالاتر است (Yoshihashi *et al.*, 2002). نتایج تجزیه ژنتیکی نشان داده است که یک ژن مغلوب (*fgR*) روی کروموزوم ۸ در کنترل عطر برنج تاثیرگذار است (Bourgis *et al.*, 2008).

تاکنون روش‌های مختلفی برای شناسایی ژنوتیپ‌های معطر و غیرعطری برنج معرفی شده است. در روش سنتی و رایج، یک گروه چند نفره از طریق چشیدن طعم دانه‌ها و یا بوییدن بافت برگ یا دانه‌ای که

جدول ۱- اسامی و منشأ ژنوتیپ‌های بومی و اصلاح شده برنج مورد ارزیابی

Table 1. Names and origin of local and improved rice genotypes in experiment

Genotype	ژنوتیپ	Type	تیپ	Origin	منشأ	Genotype	ژنوتیپ	Type	تیپ	Origin	منشأ
Tarom daylamani	طارم دیلمانی	Local	بومی	Mazandaran	مازندران	Shahpasand	شاه‌پسند	Local	بومی	Mazandaran	مازندران
Ali kazemi	علی کاظمی	Local	بومی	Guilan	گیلان	Sepidroud	سپیدرود	Improved	اصلاح‌شده	Guilan	گیلان
Domsiah	دمسیاه	Local	بومی	Guilan	گیلان	Line 6	لاین ۶	Improved	اصلاح‌شده	Guilan	گیلان
Binam	بینام	Local	بومی	Guilan	گیلان	Ghashange	قشنگه	Local	بومی	Guilan	گیلان
Fajr	فجر	Improved	اصلاح‌شده	Mazandaran	مازندران	Nemat	نعمت	Improved	اصلاح‌شده	Mazandaran	مازندران
Bahar hybrid	هیبرید بهار	Hybrid	هیبرید	Guilan	گیلان	Tarom mantaghe	طارم منطقه	Local	بومی	Mazandaran	مازندران
Tarom mahali	طارم محلی	Local	بومی	Mazandaran	مازندران	Mohamadi	محمدی	Local	بومی	Guilan	گیلان
Hashemi	هاشمی	Local	بومی	Guilan	گیلان	Amol3	آمل ۳	Improved	اصلاح‌شده	Mazandaran	مازندران
Anbarbu	عنبربو	Local	بومی	Guilan	گیلان	Khazar	خزر	Improved	اصلاح‌شده	Guilan	گیلان
Shafagh	شفق	Improved	اصلاح‌شده	Mazandaran	مازندران	Bejar	بجار	Improved	اصلاح‌شده	Guilan	گیلان
Sangjo	سنگ‌جو	Local	بومی	Mazandaran	مازندران	Dasht	دشت	Improved	اصلاح‌شده	Mazandaran	مازندران
Gohar	گوهر	Improved	اصلاح‌شده	Guilan	گیلان	Sahel	ساحل	Improved	اصلاح‌شده	Mazandaran	مازندران
Gharib siah reihani	سیاه ریحانی	Local	بومی	Guilan	گیلان	Gil3	گیل ۳	Improved	اصلاح‌شده	Guilan	گیلان
Domsefid	دم سفید	Local	بومی	Guilan	گیلان	Kadus	کادوس	Improved	اصلاح‌شده	Guilan	گیلان
Neda	ندا	Improved	اصلاح‌شده	Mazandaran	مازندران						

ژنوتیپ‌های برنج در مرحله پنجه‌دهی مطابق روش سود و سیدیگ (Sood and Siddiq, 1978) انجام شد. سنجش عطر دانه (برنج سفید) با استفاده از روش هیدروکسید پتاسیم ۱/۷ درصد نیز صورت گرفت (Kibria et al., 2008). روش ارزیابی و نمره دهی از تلفیق روش ارزیابی استاندارد برنج (IRRI, 1996) و لستاری و همکاران (Lestari et al., 2011) اقتباس شد. ۰/۲ گرم نمونه برگ از هر ژنوتیپ به قطعات مساوی و کوچک تقسیم و در لوله آزمایش حاوی هیدروکسید پتاسیم ۱/۷ درصد در سه تکرار قرار داده شد. برای سنجش عطر دانه نیز ۴۰ عدد دانه سفید شده و سالم از هر رقم در داخل ظروف پتری قرار داده و ۱۰ میلی‌لیتر محلول هیدروکسید پتاسیم ۱/۷ درصد به آن اضافه شد، سپس درپوش ظروف پتری گذاشته شده و به مدت یک ساعت در دمای اتاق قرار داده شدند. یک گروه ۴ الی ۸ نفره از افراد خبره بطور تصادفی درب لوله‌ها و همچنین ظروف پتری را باز کرده و با بویدن محتوای لوله‌ها، ارزیابی ژنوتیپ‌ها را انجام و به آنها امتیاز دادند. امتیاز صفر برای ارقام غیرعطری، ۰/۵ برای عطر متوسط و امتیاز یک برای رقم‌های معطر در نظر گرفته شد. در نهایت مجموع آراء برای هر ژنوتیپ بر تعداد افراد رأی دهنده تقسیم شد و میانگین نمره هر ژنوتیپ بین صفر تا یک محاسبه گردید. مقادیر میانگین ۰/۳۳ و کمتر برای ارقام غیرعطری و بیش از آن برای ارقام معطر در نظر گرفته شد.

جهت انجام آزمون‌های مولکولی، استخراج DNA از نمونه‌های برگ‌ی جوان به روش CTAB (Murray and Thompson, 1980) با اندکی تغییرات انجام شد. برای تعیین کیفیت DNA استخراج شده از الکتروفورز ژل آگاروز و برای تعیین کمیت (غلظت DNA) از دستگاه اسپکتروفوتومتر (Hamburg 22331, Eppendorf, Germany) استفاده شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با استفاده از دستگاه ترموسایکلر (PC818, Astec Bio, Japan) در حجم ۱۰

نشانگر در برنامه‌های اصلاحی برنج استفاده شوند. جین و همکاران (Jin et al., 2010) بر اساس اینکه برنج معطر یک حذف ۸ جفت بازی در ژن بتائین آلدهید دهیدروژناز (*Badh2*) روی کروموزوم ۸ دارد، یک جفت آغازگر برای تکثیر این حذف طراحی و از آن برای تشخیص ۴۱۶ لاین ژرم پلاسما برنج استفاده کردند، ۱۶ لاین آلل *fgr (badh2-E7)* ناشی از حذف ۸ جفت بازی در آگرون ۷ را تکثیر نمودند و آزمون عطر نیز تأیید کرد که همه ۱۶ لاین معطر هستند.

با توجه به اینکه صفت عطر در برنج ماهیت ژنتیکی دارد که بطور عمده توسط یک ژن اصلی و کلیدی روی کروموزوم شماره ۸ کنترل می‌شود؛ در این تحقیق سعی شد تا با کمک نشانگرهای مولکولی اختصاصی تعدادی از ارقام برنج بومی و اصلاح شده ایرانی برای صفت عطر مورد بررسی و ارزیابی قرار گیرند تا در صورت تأیید و کارایی مناسب، استفاده از این نشانگرها برای شناسایی ارقام عطری در ارقام مختلف و گزینش لاین‌های معطر در جمعیت‌های اصلاحی برای ژرم پلاسما برنج ایران پیشنهاد شوند.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی شامل ۲۹ ژنوتیپ محلی و اصلاح شده برنج موجود در کلکسیون مؤسسه تحقیقات برنج کشور در محل مؤسسه واقع در رشت، با طول و عرض جغرافیایی به ترتیب ۴۹ درجه و ۳۶ دقیقه شرقی و ۳۷ درجه و ۱۶ دقیقه شمالی با ارتفاع از سطح دریای آزاد ۷ متر و بافت خاک سیلتی رسی با اسیدیته ۷ در سال زراعی ۹۱-۹۰ مورد بررسی قرار گرفتند. ارقام مورد ارزیابی به گونه‌ای انتخاب شدند که تنوع لازم از نظر صفت عطر را داشته باشند. اسامی و مشخصات ژنوتیپ‌های مورد بررسی به همراه منشاء آنها در جدول یک ارائه شده است.

ارزیابی ژنوتیپ‌های مورد مطالعه بر اساس دارا بودن عطر با استفاده از برگ‌های کاملاً توسعه یافته

و ۳ درصد (با توجه به نوع آغازگر) بارگذاری و الکتروفورز با ولتاژ ثابت ۹۰ ولت به مدت ۸۰ دقیقه انجام شد. رنگ آمیزی ژل با استفاده از اتیدیوم بروماید و آشکارسازی باندها زیر نور ماوراء بنفش با استفاده از دستگاه ژل داگ (Bio-Rad 2000, USA) صورت گرفت.

در بررسی‌های مولکولی از دو نشانگر اختصاصی مبتنی بر توالی‌های مجاور ژن عطر و یک نشانگر ترکیبی تکثیر اختصاصی آلل (ASA) استفاده شد که توالی و مشخصات آغازگرها در جدول ۲ ارائه شده است.

میکرولیتزر شامل ۵۰ نانوگرم DNA الگو، ۰/۴ میلی مولار dNTPs، دو میلی مولار $MgCl_2$ ، ۰/۴ میکرو مولار از هر یک از آغازگرها، بافر PCR 1X و یک واحد آنزیم Taq پلیمرز انجام شد. چرخه حرارتی به صورت چهار دقیقه واسرشته‌سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، سپس ۳۵ چرخه بصورت ۴۰ ثانیه واسرشته‌سازی در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، ۴۰ ثانیه مرحله اتصال آغازگر بسته به دمای اتصال هر آغازگر، دو دقیقه مرحله بسط در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد و ۵ دقیقه بسط نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد بود. محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمرز روی ژل آگارز ۱/۵

جدول ۲- توالی و مشخصات آغازگرهای مورد استفاده در آزمایش

Table 2. The sequence and characteristics of used primers in this experiment

نام آغازگر Primers	توالی Sequence	دمای اتصال Annealing Temp.	منبع Reference
SSR4463-L413	5'-GACGGTGAACATTCAATTA AAAAAG-3' 3'-AGTGGGATTTTCATTAATTTCTG-5'	53	Bourgis <i>et al.</i> , 2008
5537-8	5'-CATATGGTGCACCTCAATGCCAG-3' 3'-TTTGGATCCGCCACCAACGACC-5'	60	Bourgis <i>et al.</i> , 2008
ESP	3'-TTGTTTGGAGCTTGCTGATG-5'	58	Bradbury <i>et al.</i> , 2005
IFAP	3'-CATAGGAGCAGCTGAAATATATACC-5'		
INSP	3'-CTGGTAAAAAGATTATGGCTTCA-5'		
EAP	3'-AGTGCTTTACAAAGTCCCGC-5'		

نتایج و بحث

آن‌ها از روش کروماتوگرافی گازی نیز استفاده و گزارش کردند که آزمون هیدروکسید پتاسیم در صورت زیاد بودن تعداد نمونه‌ها روش مناسبی است، اما روش کروماتوگرافی گازی به دلیل اینکه هزینه‌بر و وقت‌گیر است تنها برای تعداد کمی از نمونه‌ها و سنجش دقیق و کمی میزان عطر کاربرد دارد. سرحدی و همکاران (Sarhadi *et al.*, 2007) آزمون بویایی پس از اعمال هیدروکسید پتاسیم روی برگ برنج در مرحله‌ی خوشه‌دهی را بررسی کردند که نتایج آنها با نتایج آزمایش‌های مولکولی مشابه بود. آنها ارقامی از کشورهای مختلف از جمله ایران را مورد بررسی قرار دادند که از میان ارقام ایرانی، فجر به عنوان رقم معطر و نعمت و کادوس به عنوان رقم غیرعطری شناسایی

نتایج حاصل از ارزیابی برگ و دانه، ارقام را به دو گروه معطر- نیمه عطری (۱۶ رقم) و غیرعطری (۱۳ رقم) دسته‌بندی کرد (جدول ۳) به طوری که ارقام دمسیاه، علی کاظمی، بینام، هاشمی و طارم دیلمانی با بیشترین امتیاز به عنوان ارقام شاخص عطری و ارقام نعمت، دشت، خزر، سفیدرود و آمل ۳ به عنوان ارقام شاخص غیرعطری مشخص شدند.

جین و همکاران (Jin *et al.*, 2010) از روش ارزیابی هیدروکسید پتاسیم روی برنج قهوه‌ای و چن و همکاران (Chen *et al.*, 2006) روی برگ برنج برای تشخیص ارقام معطر و غیرعطری استفاده کردند. آنها به منظور ارزیابی دقیق عطر بوته‌های نوترکیب و نتاج

خزر، ندا، کادوس و سفیدرود به عنوان ارقام غیرعطری شناسایی شدند که با نتایج این تحقیق مشابه بود. آن‌ها بیان کردند که روش ارزیابی مبتنی بر هیدروکسید پتاسیم یک روش نسبتاً ارزان و ساده برای تشخیص ارقام معطر و غیرعطری برنج و نیز یک روش مرسوم در بسیاری از تحقیقات کیفی عطر برنج می باشد.

شدند که با نتایج این تحقیق مطابقت داشت. وزیرزنجانی و همکاران (Vazir Zanjani *et al.*, 2011) نیز روش بویایی مبتنی بر هیدروکسید پتاسیم را روی بافت برگ ارقامی از ایران، افغانستان، ازبکستان انجام دادند. از میان ارقام ایرانی رقم‌های فجر، شفق، نعمت، خزر، ندا، کادوس و سفیدرود نیز وجود داشتند که دو رقم فجر و شفق معطر و نعمت،

جدول ۳- ارزیابی عطر در ژنوتیپ‌های برنج مورد مطالعه بر اساس روش‌های سنجش کیفی

Table 3. Evaluation of fragrance in studied rice genotypes based on qualitative tests methods

شماره No.	ژنوتیپ Genotype	میانگین Mean	نتیجه نهایی Result	شماره No.	ژنوتیپ Genotype	میانگین Mean	نتیجه نهایی Result
1	Tarom dailamani	0.87	+	16	Kadous	0.20	-
2	Ali kazemi	0.87	+	17	Sepidroud	0.33	-
3	Domsiah	0.93	+	18	Line6	0.33	-
4	Binam	0.80	+	19	Ghashange	0.33	-
5	Fajr	0.44	+	20	Nemat	0.33	-
6	Bahar hybrid	0.71	+	21	Tarom mantagh	0.33	-
7	Hashemi	0.87	+	22	Mohamadi	0.33	-
8	Anbarbu	0.73	+	23	Khazar	0.33	-
9	Shafagh	0.87	+	24	Bejar	0.07	-
10	Tarom mahali	0.67	+	25	Dasht	0.27	-
11	Sangjo	0.87	+	26	Sahel	0.27	-
12	Gharib siah reihani	0.80	+	27	Gil3	0.33	-
13	Gohar	0.80	+	28	Shahpasand	0.20	-
14	Domsefid	0.27	-	29	Amol3	0.33	-
15	Neda	0.33	-				

+: Fragrant and -: Non-fragrant

+: معطر و -: غیرعطری

خشکی (Yoshihashi *et al.*, 2004)، شرایط جوی، کوددهی و چگونگی انجام مراحل داشت (Champagne, 2008) نیز می‌توانند بر محتوای تجمع عطر در برنج مؤثر باشند، یافتن روش‌های ساده و دقیق مانند نشانگرهای مولکولی پیوسته با صفت مربوطه که بتوان از آنها به عنوان یک معیار گزینش برای غربال ژنوتیپ‌ها در پروژه‌های به‌نژادی استفاده شود، بسیار مطلوب بوده و مطمئناً مورد استقبال به‌نژادگران و محققان قرار خواهد گرفت، زیرا انتخاب به کمک نشانگر به دلیل ارزیابی مستقیم ژن‌ها و حذف اثر عوامل محیطی و امکان انجام آن روی مقدار اندکی از نمونه‌های برگی و در مراحل مختلف دوره رشد گیاه،

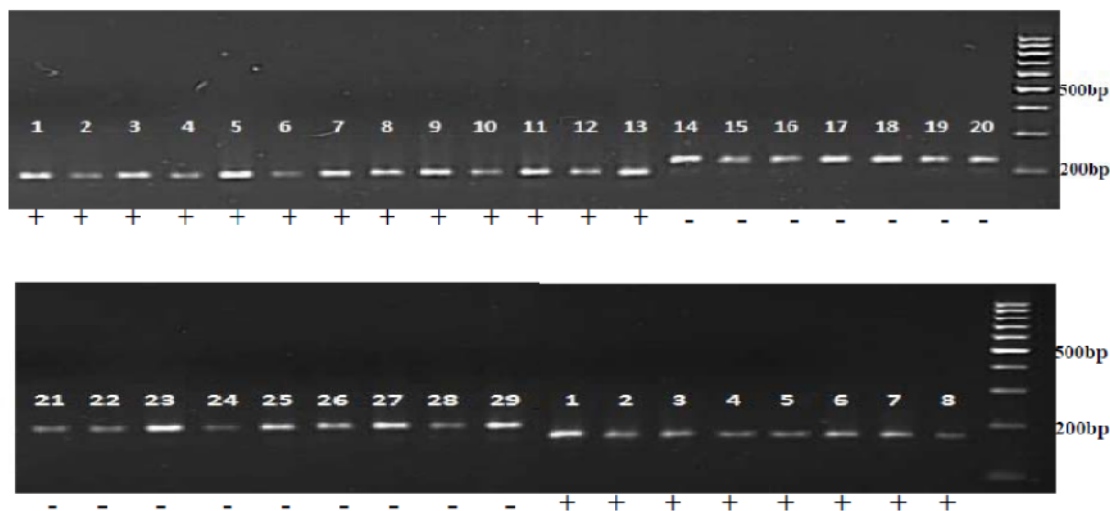
بر اساس نتایج این تحقیق و سایر مطالعات انجام شده می‌توان اظهار کرد که به طور کلی روش کیفی ارزیابی عطر که عمدتاً بر اساس حس بویایی پس از تأثیر هیدروکسید پتاسیم (که سبب آزاد شدن عطر می‌شود) طراحی شده است. این روش اگرچه مانند کروماتوگرافی گازی نمی‌تواند با قاطعیت میزان کمی و دقیق عطر را مشخص کند، اما می‌تواند با دقت قابل قبولی، عطری و یا غیرعطری بودن ژنوتیپ‌ها را مشخص نماید که با توجه به سادگی و کم هزینه بودن در مراحل اولیه تحقیق و زمانی که تعداد ژنوتیپ‌ها زیاد است، می‌تواند مورد استفاده قرار گیرد. با توجه به اینکه که عوامل محیطی مانند تنش

4463-L413 با تکثیر دو باند متفاوت با اندازه‌هایی حدود ۱۸۰ و ۲۰۰ جفت باز توانست ارقام معطر و غیرعطری را به خوبی از هم متمایز نماید که قطعه‌ی کوتاه و سبک‌تر (حدود ۱۸۰ تا ۱۹۰ جفت باز) مربوط به ارقام عطری و قطعه سنگین‌تر (حدود ۲۰۰ جفت باز) مربوط به ارقام غیرعطری بود.

بر اساس نتایج حاصل از کاربرد این نشانگر در ژنوتیپ‌های مورد مطالعه، ارقام دمسیاه، علی‌کاظمی، عنبربو، هاشمی، گوهر، غریب سیاه ریحانی، شفق، سنگ‌جو، طارم دیلمانی، بینام، طارم محلی، فجر و هیبرید بهار به عنوان ارقام معطر و ژنوتیپ‌های نعمت، دشت، ساحل، دم سفید، کادوس، ندا، سفیدرود، لاین ۶، خزر، طارم منطقه، محمدی، بجار، گیل ۳، شاه‌پسند، قشنگه و آمل ۳ به عنوان ارقام غیرعطری

امکان بررسی تعداد زیادی از نمونه‌ها را در برنامه‌های اصلاحی می‌دهد (Jin *et al.*, 2003). بر این اساس در این تحقیق کارایی استفاده از دو نوع نشانگر مولکولی شامل نشانگرهای پیوسته با ژن عطر و نشانگر ترکیبی تکثیر اختصاصی آلل برای تشخیص صفت عطر در ارقام برنج ایرانی مورد ارزیابی قرار گرفتند.

نشانگرهای پیوسته با ژن عطر: با توجه به نتایج تحقیق بورگیس و همکاران (Bourgis *et al.*, 2008) نشانگر SSR، 4463-L413 و نیز نشانگر مبتنی بر PCR، 5537-8 در یک ناحیه ۱۶۷ کیلو جفت بازی طرفین توالی ژن اصلی عطر روی کروموزوم شماره هشت قرار دارند، بنابراین در این تحقیق از توالی این دو نشانگر جهت متمایز کردن ارقام ایرانی معطر و غیرعطری استفاده شد. همان‌طور که در شکل یک مشاهده می‌شود در محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمراز، نشانگر



شکل ۱- چند شکلی مشاهده شده برای نشانگر 4463-L413 در ژنوتیپ‌های برنج مورد ارزیابی روی ژل آگارز ۳ درصد و نشانگر اندازه ۱۰۰bp. شماره گذاری ژنوتیپ‌ها بر اساس جدول ۳ تنظیم شده است. علامت مثبت برای ژنوتیپ‌های معطر و علامت منفی برای ژنوتیپ‌های غیرعطری می‌باشند. (برای مقایسه بهتر تعدادی از ژنوتیپ‌ها در ژل پایین تکرار شده است)

Fig. 1. Observed polymorphism for 4463-L413 marker in rice genotypes on 3% agarose gel and 100 bp ladder. The genotypes are in the base of table 3. Positive (+) shows fragrance genotypes and negative (-) shows non-fragrance genotypes. (Some genotypes were repeated in bottom gel for better comparisons)

روی ژل آگارز ۱/۵ درصد تفکیک شد که نتایج آن در شکل دو ارائه شده است. قطعه‌ی تولید شده با اندازه حدود ۵۸۰ جفت باز به عنوان کنترل مثبت در همه نمونه‌ها وجود داشت که مربوط به تکثیر با آغازگرهای EAP, ESP و خارج ناحیه‌ای جهش یافته می‌باشد. دو آغازگر INSP, IFAP بصورت ترکیبی با دو آغازگر فوق مسئول تکثیر داخل ناحیه جهش یافته به منظور تفکیک ارقام عطری از غیرعطری می‌باشند، بدین صورت که آغازگرهای EAP و IFAP ناحیه‌ای به طول ۲۵۷ جفت باز را در ارقام معطر و آغازگرهای EAP و INSP ناحیه‌ای به طول ۳۵۵ جفت باز را در ارقام غیرعطری تکثیر می‌کنند. ژنوتیپ‌های هتروزیگوت نیز با داشتن هر سه نوع باند ۵۸۰، ۲۵۷ و ۳۵۵ جفت بازی به عنوان ژنوتیپ‌های غیرعطری (به دلیل غالبیت ژن مذکور) مشخص شدند (Bradbury et al., 2005).

بر این اساس از ۳۱ ژنوتیپ مورد مطالعه، ۱۳ ژنوتیپ شامل دمسیاه، علی کاظمی، هاشمی، عنبربو، بینام، طارم محلی، فجر، طارم دیلمانی، گوهر، غریب سیاه ریحانی، شفق، سنگ جو و هیبرید بهار با تکثیر قطعه‌ی ۲۵۷ جفت بازی، علاوه بر قطعه ۵۸۰ جفت بازی، به عنوان ژنوتیپ‌های معطر و هموزیگوت شناسایی شدند، اما ۱۶ ژنوتیپ دیگر به عنوان ژنوتیپ‌های غیرعطری تشخیص داده شدند که آزمون بویایی با استفاده از هیدروکسید پتاسیم نیز نتایج حاصل از تجزیه فوق را تأیید کرد (جدول ۴). در میان ۱۶ ژنوتیپ غیرعطری رقم دم سفید با تولید دو قطعه ۳۵۵ و ۲۵۷ جفت بازی علاوه بر قطعه‌ی ۵۸۰ جفت بازی، غیرعطری هتروزیگوت تشخیص داده شد. احتمالاً عدم خلوص سبب نمایش هتروزیگوتی در این جایگاه ژنی شده است که این پدیده ممکن است حتی در اثر دگرگشتی بسیار اندک نیز بوجود آید.

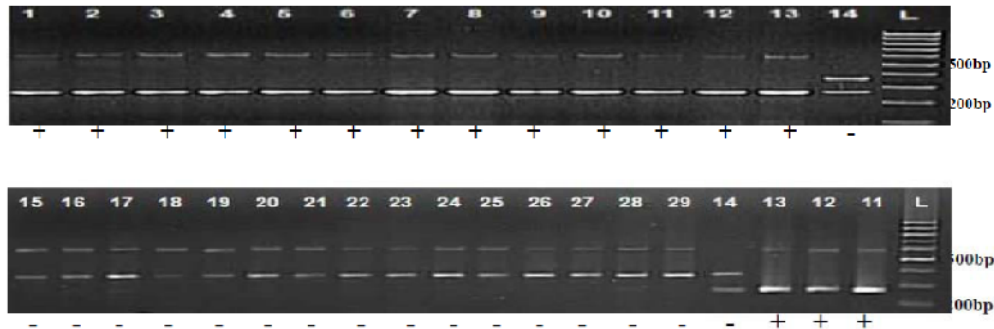
برادبری و همکاران (Bradbury et al., 2005) با استفاده از این آغازگرهای ترکیبی، ۱۶۸ بوته F₂ در حال تفرق برای عطر را مورد ارزیابی قرار دادند که

شناسایی شدند که این موضوع با نتایج حاصل از ارزیابی کیفی عطر با روش هیدروکسید پتاسیم منطبق بود. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که احتمالاً این نشانگر، یک نشانگر اختصاصی صفت عطر در ژنوتیپ‌های برنج ایرانی است و از آن می‌توان به عنوان یک معیار گزینش ساده، کم هزینه و سریع در شناسایی ژنوتیپ‌های معطر و غیرعطری استفاده کرد.

بر خلاف نشانگر 4463-L413، نشانگر 5537-8 هیچ‌گونه چندشکلی بین ژنوتیپ‌های متفاوت معطر و غیرمعطر برنج نشان نداد و در تمامی ارقام مورد مطالعه یک باند با اندازه‌ای در حدود ۶۰۰ جفت باز تکثیر شد. بر این اساس به نظر می‌رسد که علی‌رغم کارایی این نشانگر در ارقام ژاپونیکا، جهت تفکیک ارقام معطر و غیرمعطر ایرانی قابل توصیه نمی‌باشد. این نتیجه نشان می‌دهد بیان ژن‌ها مستقل از هم نبوده، بلکه کنترل و تنظیم یک ژن در ارتباط و تعامل با سایر ژن‌ها است. بر این اساس با تغییر ماهیت ژنتیکی ممکن است تظاهر ژن‌ها دستخوش تغییر شود، کما اینکه این نشانگر در ژنوتیپ‌های ژاپونیکا قابلیت تمایز ژنوتیپ‌های عطری و غیر عطری را دارد، ولی در نمونه‌های ایرانی فاقد این قابلیت بود. بر این اساس می‌توان اظهار داشت که برای توصیه یک نشانگر اختصاصی در برنامه اصلاحی برای گزینش غیرمستقیم، ارزیابی کارایی نشانگر با یک آزمایش مقدماتی ضروری است.

نشانگر ترکیبی تکثیر اختصاصی آلل (ASA): این روش مبتنی بر یک حذف هشت جفت بازی در اگزون هفت ژن کدکننده بتائین آلدئید دهیدروژناز (BADH2) روی کروموزوم هشت برنج می‌باشد. بر این اساس چهار آغازگر EAP, ESP, INSP, IFAP به طور ترکیبی و با نسبت مساوی برای انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمرز استفاده شد (جدول ۲) (Bradbury et al., 2005).

با استفاده از آغازگرهای فوق واکنش زنجیره‌ای پلیمرز برای ارقام مورد بررسی انجام و فرآورده تکثیر



شکل ۲- چند شکلی مشاهده شده برای نشانگر آلل اختصاصی (ASA) برای عطر در ژنوتیپ‌های برنج مورد مطالعه روی ژل آگارز ۱/۵ درصد و نشانگر اندازه ۱۰۰bp. شماره گذاری ژنوتیپ‌ها بر اساس جدول ۳ تنظیم شده است. علامت مثبت برای ژنوتیپ‌های معطر و علامت منفی برای ژنوتیپ‌های غیر عطری می‌باشند. (برای مقایسه بهتر تعدادی از ژنوتیپ‌ها در ژل پایین تکرار شده است)

Fig.2. Observed polymorphism for ASA marker in rice genotypes on 1.5 % agarose gel and 100 bp ladder.

The genotypes are in the base of table 3. Positive (+) shows fragrance genotypes and negative (-) shows non fragrance genotypes. (Some genotypes were repeated in bottom gel for better comparisons)

جدول ۴- مقایسه‌ی نتایج ارزیابی فنوتیپی و نشانگرهای مولکولی برای صفت عطر در ژنوتیپ‌های برنج

Table 4. Comparison phenotyping and molecular markers results for fragrance in rice genotypes

Genotype	ژنوتیپ	ارزیابی فنوتیپی Phenotypic evaluation	نشانگر		Genotype	ژنوتیپ	نشانگر	
			Marker 4463- L413	نشانگر Marker ASA			ارزیابی فنوتیپی Phenotypic evaluation	Marker 4463- L413
Tarom dilamani	طارم دیلمانی	+	+	+	Kadous	کادوس	-	-
Ali kazemi	علی کاظمی	+	+	+	Sepidroud	سپیدرود	-	-
Domsiah	دمسیاه	+	+	+	Line6	لاین ۶	-	-
Binam	بینام	+	+	+	Ghashange	قشنگه	-	-
Fajr	فجر	+	+	+	Nemat	نعمت	-	-
Bahar hybrid	هیبرید بهار	+	+	+	Neda	ندا	-	-
Hashemi	هاشمی	+	+	+	Mohamadi	محمدی	-	-
Anbarbu	عنبربو	+	+	+	Khazar	خزر	-	-
Shafagh	شفق	+	+	+	Bejar	بجار	-	-
Tarom mahali	طارم محلی	+	+	+	Dasht	دشت	-	-
Sangjo	سنگ‌جو	+	+	+	Sahel	ساحل	-	-
Gharib siah reihani	سیاه‌ریحانی	+	+	+	Gil3	گیل ۳	-	-
Gohar	گوهر	+	+	+	Shahpasand	شاه‌پسند	-	-
Domsefid	دم سفید	-	-	-	Amol3	آمل ۳	-	-
Tarom mantaghe	طارم منطقه	-	-	-				

+: Fragrant and -: Non-fragrant

+: معطر و -: غیر عطری

برای انتخاب بوته‌های مطلوب از نظر عطر در جمعیت‌های F₂ حاصل از تلاقی‌های بین دو رقم

فنوتیپ آن‌ها با دقت صد در صد تعیین شد. کیانی (Kiani, 2011) از روش تکثیر اختصاصی آلل (ASA)

مطابقت داشت.

آرخی و احمدی‌خواه (Arkhi and Ahmadikhah, 2009) در آزمایشی، ۳۵ رقم و لاین برنج را از نظر عطر مورد مطالعه قرار دادند. آن‌ها دو جفت آغازگر *Arml1* را بر اساس توالی ژن عطر طراحی کردند که حذف ۸ جفت باز در ژن عطر را احاطه می‌کرد. این محققین، ارقام دمسیاه، هاشمی، بینام و سنگ‌جو را به عنوان ارقام معطر، طارم محلی، دم زرد، نعمت، بجار و عنبربو را نسبتاً عطری و ارقام ندا، دشت، کادوس، آمل ۳، خزر و قشنگه را غیر عطری گزارش نمودند. در تحقیق حاضر نیز ارقامی مانند دمسیاه، هاشمی، بینام و سنگ‌جو، عطری و ندا، دشت، کادوس، آمل ۳، خزر و قشنگه غیر عطری تشخیص داده شدند که با نتایج آن‌ها مطابقت داشت. مقایسه نتایج بررسی‌های مولکولی در تحقیق حاضر و سایر محققان مربوطه در اکثر موارد مطابقت و مشابهت زیادی را برای بسیاری از ارقام نشان داد، اگرچه مغایرت و تفاوت‌هایی نیز در بعضی از نتایج دیده می‌شود که می‌تواند ناشی از تفاوت در شرایط آزمایش، وجود غیریکخوانی در ارقام بومی و از همه مهم‌تر تفاوت در منبع تهیه‌ی بذر باشد.

گزینش غیر مستقیم به کمک نشانگرها باعث تسریع و افزایش دقت در تحقیقات به‌نژادی می‌شود که اهمیت این موضوع بخصوص در مورد صفات مرتبط با کیفیت دانه همچون عطر برنج که عمدتاً در مراحل انتهایی رشد گیاه قابل ارزیابی می‌باشد، بیشتر محسوس است. استفاده از نشانگرهای اختصاصی می‌تواند بدور از اثر عوامل محیطی در همان مراحل اولیه رشدی، گزینش ژنوتیپ مطلوب را برای محقق میسر سازد، ضمن اینکه تمایز افراد هتروزیگوت از هموزیگوت که در ارزیابی فنوتیپی امکان‌پذیر نیست، با این روش قابل تشخیص می‌باشد. این موضوع به تصمیم‌گیری به موقع اصلاحگر کمک شایانی می‌نماید.

کشف و کاربردی کردن استفاده از نشانگرهای اختصاصی برای صفات مهم و ارزشمند زراعی

پرمحصول ندا و نعمت با واریته‌های بومی معطر سنگ طارم و طارم دیلمانی استفاده کرد. این نشانگرها در جمعیت‌های F_2 حاصل از تلاقی سنگ طارم × ندا، سنگ طارم × نعمت، طارم دیلمانی × ندا و طارم دیلمانی × نعمت برای ارزیابی فنوتیپی نسبت سه به یک (غیر عطری به معطر) و برای ارزیابی مولکولی نسبت یک به دو به یک (معطر - هتروزیگوت و غیر عطری) نشان دادند. ضمناً ارقام سنگ طارم و طارم دیلمانی معطر و نعمت و ندا به عنوان واریته‌های غیر عطری شناسایی شدند که نتایج حاصل از سه ژنوتیپ طارم دیلمانی، نعمت و ندا که در دو تحقیق مشترک هستند، با نتایج تحقیق حاضر مطابقت دارد. وزیرزنجانی و همکاران (Vazir Zanjani et al., 2011) در آزمایشی با استفاده از روش ASA، ارقامی از ایران، افغانستان، ازبکستان و ارقام شاهد شامل Nipponbare، جاسمین ۸۵ و باسماتی ۳۷۰ و نیز ترکیب‌های تلاقی Pashadi Konar × LTH و Nipponbare × Jasmin 85 مورد بررسی قرار دادند. در بوته‌های F_2 نسبت یک عطری به سه غیر عطری مشاهده شد که نشان دهنده‌ی این است که عطر توسط یک ژن مغلوب کنترل می‌شود. از میان ۱۶ رقم ایرانی مورد بررسی ارقام شفق، فجر، درفک، زاینده‌رود، سازندگی، قصرالدشتی عطری و پویا، شیرودی، خزر، تابش، نعمت، ندا، کادوس، صالح، سفیدرود و درودزن غیر عطری تشخیص داده شدند که در تحقیق حاضر نیز ارقام فجر و شفق عطری و نعمت، ندا، کادوس، سفیدرود و خزر به عنوان ارقام غیر عطری تشخیص داده شدند. سرحدی و همکاران (Sarhadi et al., 2007) نیز با استفاده از این آغازگرها، شش رقم از ده رقم افغانی و دو رقم از هفت رقم ایرانی را معطر و تمام ارقام انتخابی ازبک را غیر عطری تشخیص دادند. از بین ارقام ایرانی فجر و قصرالدشتی معطر و بقیه ارقام شامل پویا، شیرودی، نعمت، کادوس و درودزن غیر عطری بودند که نتایج مربوط به فجر، نعمت و کادوس که در دو تحقیق مشترک بودند،

تعیین وضعیت عطر آنها در طیف وسیعی از ژنوتیپ‌های بومی و اصلاح شده و همچنین ارزیابی جمعیت‌های در حال تفرق با دقت بالا قابل استفاده خواهند بود.

سپاسگزاری

این تحقیق با مساعدت مالی معاونت پژوهشی و کمیته زیست فناوری دانشگاه گیلان و همکاری موسسه تحقیقات برنج کشور صورت گرفته است که بدین وسیله نگارندگان تشکر خود را از حمایت‌های این سه حوزه اعلام می‌نمایند.

همواره یکی از موضوعات مورد توجه به‌نژادگران بوده است. در این راستا پس از شناسایی اینگونه نشانگرها لازم است کارایی آنها در ژرم پلاسماهای مختلف ارزیابی شود، زیرا بیان و عملکرد ژن‌ها مستقل نبوده و بصورت یک شبکه پیچیده و در تعامل با سایر ژن‌ها و محیط کنترل می‌شود. نتایج این تحقیق نشان داد که نشانگر تکثیر اختصاصی آلل و نشانگر SSR، 4463-L413 از قابلیت و کارایی بالایی در تشخیص نمونه‌های عطری و غیرعطری در ژنوتیپ‌های برنج ایرانی دارند، بنابراین احتمالاً به عنوان یک روش ساده برای غربالگری ژنوتیپ‌های برنج جهت

منابع مورد استفاده

References

- Arkhi A. and A. Ahmadikhah. 2009.** Development and identification of a specific co-dominant and perfect marker based on aroma gene sequence for genotyping rice cultivars. 6th National Biotechnology Congress of Iran, 13-15 Aug. 2009, Milad Tower Conference Hall, Tehran-Iran. (In Persian)
- Bourgis, F., R. Guyot, H. Gherbi, E. Tailliez, I. Amabile, J. Salse, M. Lorieux, M. Delseny and A. Ghesquiere. 2008.** Characterization of the major fragrance gene from an aromatic *Japonica* rice and analysis of diversity in Asian cultivated rice. *Theor. Appl. Genet.* 117: 353- 368.
- Bradbury, L. M. T., R. J. Henry, Q. Jin, R. F. Reinke and D. L. E. Waters. 2005.** A perfect marker for fragrance genotyping in rice. *Mol. Breed.* 16: 279- 283.
- Brar, D. S., P. S. Virk, D. Grewal, I. Slamet-Loedin, M. Fitzgerald and G. S. Khus. 2012.** Breeding rice varieties with improved grain and nutritional quality. *Quality Assurance and Safety of Crops & Foods.* 4 (3): 137. (Abstract).
- Buttery, R. G., L. C. Ling, B. O. Juliano and J. G. Turnbaugh. 1983.** Cooked rice aroma and 2-acetylpyrroline. *J. Agric. Food Chem.* 31: 823-826.
- Champagne, E. T. 2008.** Rice aroma and flavor: a literature review. *Cereal Chem.* 854: 445-454.
- Chen, S., J. Wu, Y. Yang, W. Shi and M. Xu. 2006.** The *fgr* gene responsible for fragrance was restricted within 69 kb. *Plant Sci.* 171: 505- 514.
- International Rice Research Institute (IRRI).** Standard Evaluation System for Rice. 1996. Manila, Philippines. P: 52.
- Jin, Q., D. Waters, G. M. Cordeiro, R. J. Henry and R. F. Reinke. 2003.** A single nucleotide polymorphism (SNP) marker linked to the fragrance gene in rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Sci.* 165: 359- 364.
- Jin, L., Y. Lu, Y. Shao, G. Zhang, P. Xiao, S. Shen, H. Corke and J. Bao. 2010.** Molecular marker assisted

- selection for improvement of eating, cooking and sensory quality of rice (*Oryza sativa* L.). J. Cereal Sci. 51: 159-164.
- Kiani, G. 2011.** Marker aided selection for aroma in F2 populations of rice. Afric. J. Biotechnol. 10: 15845-15848.
- Kibria, K., M. M. Islam and S. N. Begum. 2008.** Screening of aromatic rice lines by phenotypic and molecular markers. Bangladesh J. Bot. 37 : 141- 147
- Lang, N. T. and B. C. Buu. 2008.** Development of PCR-based markers for aroma (*fgf*) gene in rice (*Oryza sativa* L.). Omonrice 16: 16-23.
- Lestari, A. P., B. Abdullah, A. Junaedi and H. Aswidinnoor. 2011.** Performance of grain quality and aroma of aromatic new plant type promising rice lines. Indonesian J. Agric. Sci. 12: 84-93.
- Lorieux, M., N. Petrov, N. Huang, E. Guiderdoni and A. Ghesquiere. 1996.** Aroma in rice: genetic analysis of a quantitative trait. Theor. Appl. Genet. 93: 1145- 1151.
- Murray, M. and W. F. Thompson. 1980.** Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. Nucleic Acid Res. 8: 4321- 4325.
- Sakthivel, K., R. M. Sundaram, N. Shobha Rani, S. M. Balachandran and C. N. Neeraja. 2009.** Genetic and molecular basis of fragrance in rice. Biotechnol. Adv. 27: 468- 473.
- Sarhadi, W. A., N. L. Hien, M. Zanjani, W. Yosofzai, T. Yoshihashi and Y. Hirata. 2007.** Comparative analysis for aroma and agronomic traits of native rice cultivars from central Asia. J. Crop Sci. Biotechnol. 11: 17- 22.
- Shi, W., Y. Yang, S. Chen and M. Xu. 2008.** Discovery of a new fragrance allele and the development of functional markers for the breeding of fragrant rice varieties. Mol. Breed. 22:185-192.
- Sood, B. C. and E. A. Siddiq. 1978.** A rapid technique for scent determination in rice. Indian J. Genet. Plant Breed. 38: 268- 271.
- Vazir Zanjani, M., W. A. Sarhadi, J. J. Nwe, M. Khalaj Amirhosseini, R. Siranet, N. Q. Trung, S. Kawai and Y. Hirata. 2011.** Characterization of aromatic rice cultivars from Iran and surrounding regions for aroma and agronomic Traits. SABRAO J. Breed. Genet. 43: 15-26.
- Yoshihashi, T., 2002.** Quantitative analysis on 2- acetyl- 1- pyrroline of an aromatic rice by stable isotope dilution method and model studies on its formation during cooking. J. Food Sci. 67: 619- 622.
- Yoshihashi, T., T. T. H. Nguyen and N. Kabaki. 2004.** Area dependency of 2- acetyl- 1- pyrroline content in an aromatic rice variety, Khao Dawk Mali 105. JARQ- Japan Agric. Res. Quart. 38: 105- 109.

Phenotypic and molecular evaluation of fragrance in Iranian rice genotypes

Karami, N.¹, A. Aalami², H. Samizadeh³, M. Alahgholipour⁴ and B. Rabiei⁵

ABSTRACT

Karami, N., A. Aalami, H. Samizadeh, M. Alahgholipour and B. Rabiei. Phenotypic and molecular evaluation of fragrance in Iranian rice genotypes. *Iranian Journal of Crop Sciences*. 16(1):12 -24. (In Persian).

One of the important factors determining the rice grain quality is fragrance. In this experiment, 29 Iranian rice cultivars were analyzed for aroma using qualitative test, 1.7% KOH sensory test on leaves and grains and molecular methods based on specific markers at Rice Research Institute of Iran, Rasht, Iran in 2011. Qualitative fragrance test divided rice varieties into two fragrant and non-fragrant categories; 13 fragrant and 16 non-fragrant cultivars were identified. Superior fragrant cultivars were Domsiah, Alikazemi, Binam, Fajr and Hashemi and the most non-fragrant cultivars identified as Nemat, Khazar, Neda, Sepidroud and Dasht. Molecular evaluation results based on SSR4463-L413 and allele specific amplification (ASA) markers indicated that SSR4463-L413 marker was polymorphic in fragrant and non-fragrant cultivars. SSR4463-L413 marker also identified 13 fragrant and the others as non-fragrant cultivars. This finding was similar to qualitative test of aroma. ASA marker also identified 13 cultivars fragrant and the others as non-fragrant. Results of this study indicated that SSR4463-L413 marker can discriminate aromatic and non-aromatic Iranian rice cultivars with high resolution, therefore, it can be used as an efficient marker for evaluating and fast screening of genotypes in the rice segregating population. Also, the results indicated that ASA marker, in addition to ability in predicting homozygous aromatic and non-aromatic cultivars, it could identify heterozygous non-aromatic individual rice plants; therefore, it can be suggested as a co-dominant marker for selection in rice segregating population for aroma.

Key words: 2-acetyl-1-pyrroline, Betaine aldehyde dehydrogenase, Rice, Specific Allele and Specific marker.

Received: June, 2013 **Accepted:** April 2014

1- M.Sc. Student, University of Guilan, Rasht, Iran

2- Assistant Prof., University of Guilan, Rasht, Iran. (Corresponding author) (Email: ali_aalami@yahoo.com)

3- Associate Prof., University of Guilan, Rasht, Iran

4- Faculty member, Rice Research Institute of Iran, Rasht, Iran

5- Professor, University of Guilan, Rasht, Iran